

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

Purificación y Caracterización de la
D-Aminoácido Oxidasa de
Rhodotorula gracilis (ATCC 26217)



TESIS DOCTORAL

por

Fernando Antonio Ramón Olayo



* 5 3 0 9 8 6 4 4 7 7 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-381969-4

Directoras

Dra. Carmen Acebal Sarabia

Dra. M^a Pilar Castellón Borreguero

MADRID, ABRIL DE 1999



BIBLIOTECA

A mi esposa (Unamis) e hijo (Caspurriales)

Agradecimientos

Al desarrollo del presente trabajo experimental han contribuido desde diferentes frentes muchas personas sin las cuáles habría sido del todo imposible su conclusión.

En primer lugar, quiero agradecer a mi mujer su incondicional y a menudo aventurero apoyo que ha sido determinante en el desenlace de algunos capítulos de desesperación. En justicia, este es más su trabajo de Tesis doctoral que el mío porque ella ha guardado la estabilidad en la retaguardia del mismo a pesar de haber intentado sin éxito empezar el suyo propio poco después de nuestra llegada a España desde la mayor de las Antillas. La alegría que transmite mi hijo ha sido el combustible que ha mantenido el motor funcionando. A mis padres, por haberme facilitado en todo momento la formación y por haber propiciado, con los acalorados debates de sobremesa cuyo origen es anterior a mis primeros recuerdos, unas mentes inquietas en mí y en mis hermanos, quienes también merecen reconocimiento por haberse tragado alguna de mis indigeribles charlitas.

Mi acceso al mundo de la investigación académica en España se debe, en primer lugar a la ayuda impagable de la Profesora Carmen Acebal, quien desde entonces me ha apoyado, protegido y orientado ininterrumpidamente y a la confianza que en mí depositó el Profesor Roberto Arche, cuya repentina muerte dejó una herida incurable en todos los que le conocíamos y nos privó a los que formábamos su grupo de investigación de expresarle nuestra infinita gratitud por habernos acogido en su laboratorio. Junto a este triste recuerdo guardo los entrañables momentos de iniciación en la investigación bioquímica junto a Ana Roa y Teresa Conejo, quienes no pocas veces me acompañaron en verdaderos asaltos a los veteranos del Departamento para saciar nuestra sed de conocimientos.

Al Profesor Jose Luis García nunca podremos agradecerle suficientemente el haberse ofrecido, tras la pérdida de Roberto, a ayudar en lo que fuese necesario para la continuación de nuestros doctorados. Los meses que pasé en su laboratorio me posibilitaron el aprendizaje de nuevas técnicas y descubrí que los genios no siempre son llamativos y extravagantes. De hecho, Jose Luis es tan discreto y modesto que el que no trabaje directamente con él puede llegar a pensar que es sólo un investigador más, del montón.

Al mencionar a Carmen y M^a Pilar no me puedo ceñir al ámbito de la dirección de este trabajo, en el que su actuación ha sido admirable por su capacidad de hacer que un doctorando se sienta, a la vez, arropado y libre. Debo agradecerles aún más su extraordinario apoyo moral, la atención que han prestado a mis problemas personales y la voluntad incondicional de ayudarme a resolverlos. Isabel de la Mata es en verdad codirectora y coautora de este trabajo. La comprensión mutua que ha surgido entre nosotros se debe en buena medida a que ambos hemos desarrollado nuestras habilidades en la crianza de hijos simultáneamente y las narraciones de la última trastada de nuestros hijos ha precedido frecuentemente a los experimentos del día. Virginia Obregón y Raquel Torres han tomado el relevo en diferentes frentes y han demostrado que están tallados en madera de investigador con incrustaciones de simpatía y sensibilidad. A Virginia debo agradecerle especialmente haber posibilitado la conclusión de algunas secciones de este trabajo cuando yo ya no podía dedicarme en exclusiva a la labor experimental del mismo. Antonio Ayllón y Stefano Iannacone han contribuido a los estudios de fermentación y purificación.

En el grupo de Carmen y M^a Pilar se doctoró poco antes de entrar yo una de las cabezas mejor amuebladas en 5000 Km alrededor de Navarra. Lo que yo no sabía en aquel momento es que Ricardo Macarrón me iba a ofrecer su valiosísima amistad y que, gracias a él, trabajaríamos juntos años más tarde. A Emilio Díez y Steve Elson debo agradecerles haber apostado por mí y haberme permitido continuar mi trabajo de Tesis usando en ocasiones los recursos del Centro de Investigación Básica de SmithKline Beecham, en el que otros compañeros como Jose M^a Sanchez-Puelles y Jesús de la Fuente han ofrecido su ayuda.

El presente trabajo experimental se ha llevado a cabo bajo el amparo económico de la empresa ANTIBIÓTICOS S.A., a cuyo director de investigación, Dr. Francisco Salto, deseo expresar mi gratitud.

Abreviaturas

6-APA	ácido 6-aminopenicilánico
7-ACA	ácido 7-aminocefalosporánico
BFA	ácido benzoilfórmico
BIS-TRIS propano	1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano
BNPS-skatol	3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenilmercapto)-3H-indol
Cef C	cefalosporina C
DAAO	D-aminoácido oxidasa
DEAE	dietilaminoetil
DEP	dietilpirocarbonato
DNPH	2,4-dinitrofenilhidracina
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FAD	flavín-adenín dinucleótido
FPLC	cromatografía líquida de alta resolución / baja presión
G-7-ACA	ácido glutaril-7-aminocefalosporánico
G7AA	G-7-ACA acilasa
GuCl	cloruro de guanidinio
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución / alta presión
MES	ácido 2-N-morfolin-etanosulfónico
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PHMB	p-hidroximercuriobenzoato
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SDS	dodecilsulfato sódico
TCNK	tiocianato potásico
TNBS	ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico
TNM	tetranitrometano

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS	2
1.1. Antecedentes históricos	2
1.2. Biotransformación de penicilinas y cefalosporinas.....	3
2. FLAVOPROTEINAS.....	6
2.1. Características generales de las flavoenzimas	6
2.2. Estudio de las reacciones catalizadas por oxidasas.....	8
3. D-AMINOÁCIDO OXIDASAS	9
3.1. Distribución, localización y papel fisiológico.....	9
3.2. Enzima de riñón de cerdo	11
3.3. Enzima de <i>Rhodotorula gracilis</i>	14
3.4. Estudios de la estructura primaria y del centro activo	16
3.5. El H_2O_2 como producto y como modificador	21
4. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
1. MATERIALES.....	25
2. FERMENTACIÓN DE LA LEVADURA	25
2.1. Mantenimiento de la cepa	25
2.2. Condiciones de inducción y producción	25
2.3. Curva de crecimiento y producción	26
3. PURIFICACIÓN DE LA D-AMINOÁCIDO OXIDASA	28
3.1. Purificación a partir de cultivos de <i>Rhodotorula gracilis</i>	28
3.1.1. Ruptura/permeabilización de la pared celular.....	28
3.1.1.1. Métodos mecánicos	29
3.1.1.2. Métodos térmicos	29
3.1.1.3. Métodos químicos	29
3.1.1.4. Métodos enzimáticos	30
3.1.1.5. Métodos combinados.....	30
3.1.2. Estabilidad a 4°C en presencia de diferentes efectores.....	31
3.1.3. Precipitación con sulfato amónico	32
3.1.4. Desalado en Sephadex G-25	32
3.1.5. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel	32
3.1.6. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas en Phenyl-Sepharose CL-4B.....	32
3.1.7. Cromatografía de intercambio catiónico en cartucho Mono-S (fast-flow)	33
3.1.8. Cromatografía de intercambio aniónico en cartucho Mono-Q (fast-flow)	33
3.2. Purificación a partir de un clon de <i>E.coli</i> que hiperexpresa DAAO	34
3.2.1. Ruptura celular	34
3.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sephacel.....	34
3.2.4. Cromatografía de afinidad en Cibacron-Blue	34

3.2.5. Cromatografía de penetrabilidad en Ultrogel AcA-44.....	34
4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	35
4.1. Cuantificación de proteína	35
4.2. Métodos de ensayo de la actividad DAAO	36
4.2.1. Valoración del H ₂ O ₂	36
4.2.2. Valoración del α -cetoácido.....	36
4.2.2.1. Titulación de grupos ceto	36
4.2.2.2. Valoración espectrofotométrica	37
4.2.3. Ensayo con cefalosporina C mediante HPLC	37
5. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS	38
5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.....	38
5.2. Electroforesis en condiciones nativas y tinción de actividad.....	38
5.3. Isoelectroenfoque analítico	39
6. OBTENCIÓN DE LA APOPROTEÍNA.....	39
7. RECONSTITUCIÓN DE LA HOLOENZIMA	39
8. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	40
8.1. Determinación de la masa molecular	40
8.2. Análisis de aminoácidos	40
8.3. Espectroscopía de absorción	40
8.4. Espectroscopía de fluorescencia	40
8.5. Dicroísmo circular	41
8.6. Análisis de la secuencia de aminoácidos	41
9. ESTUDIO DE LA UNIÓN DEL FAD.....	44
9.1. Determinación de la constante de disociación	44
9.2. Caracterización de la unión del cofactor.....	46
10. ESTUDIOS DE LA INACTIVACIÓN POR H ₂ O ₂	47
10.1. Estudios de inhibición por producto	47
10.2. Modificación química.....	47
10.2.1. Cinética de inactivación	47
10.2.2. Valoración de cisteínas	48
10.2.2.1. Análisis de aminoácidos.....	48
10.2.2.2. Reacción con DTNB.....	48
10.2.3. Valoración de metioninas.....	48
10.2.4. Valoración de triptófanos.....	49
10.2.4.1. Espectroscopía de fluorescencia.....	49
10.2.4.2. Espectroscopía de absorción	49
10.2.5. Caracterización de la unión del FAD a la DAAO modificada.....	49
10.2.6. Cromatografía de penetrabilidad en HPLC.....	50
11. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO QUÍMICO	50
11.1. Estudios de variación de pH	50

11.1.1. Efecto del pH sobre la cinética de la reacción con D-alanina.....	55
11.1.2. Variación de la K_i de un inhibidor competitivo con el pH.....	56
11.1.3. Efecto de la alteración de la constante dieléctrica del medio	56
11.1.4. Efecto de la temperatura sobre los pK's: Entalpías de ionización	56
11.2. Estudios de modificación química.....	57
11.2.1. Modificación de argininas con fenilgloxal	57
11.2.2. Modificación de lisinas con TNBS	57
11.2.3. Modificación de cisteínas con PHMB	57
11.2.4. Modificación de tirosinas con tetranitrometano y N-acetilimidazol.....	57
11.2.5. Modificación de histidinas con dietilpirocarbonato (DEP)	58
11.2.5.1. Cinética de descomposición del DEP.....	58
11.2.5.2. Cinética de inactivación	58
11.2.5.3. Cálculo del número de histidinas esenciales	59
11.2.5.4. Dependencia del pH	59
11.2.5.5. Reversión de la modificación	60
11.2.5.6. Estudios de protección.....	60
11.2.6. Modificación de triptófanos con <i>N</i> -bromosuccinimida (NBS).....	60
11.2.6.1. Cinética de inactivación	60
11.2.6.2. Espectroscopía de absorción	61
11.2.6.3. Espectrofluorimetría.....	61
11.2.6.4. Estudios de protección.....	61
11.2.6.5. Cromatografía de penetrabilidad en HPLC.....	62
RESULTADOS	63
1. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DAAO	64
1.1. Curva de crecimiento y producción	64
1.2. Ruptura/permeabilización de la pared celular.....	69
1.3. Mejora de la estabilidad a 4°C.....	70
1.4. Purificación de DAAO.....	71
1.4.1. Purificación a partir de cultivos de <i>Rhodotorula gracilis</i>	71
1.4.2. Purificación a partir de un clon de <i>Escherichia coli</i> que hiperexpresa DAAO	76
2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	79
2.1. Determinación de la masa molecular	79
2.2. Determinación del punto isoelectrico	80
2.3. Análisis de aminoácidos	80
2.4. Estudios espectroscópicos.....	81
2.5. Análisis de la secuencia de aminoácidos	83
3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL	87
3.1. Estudios de la unión del FAD	87
3.2. Especificidad de sustrato.....	88
3.3. Estabilidad frente a pH y temperatura.....	89
4. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL H ₂ O ₂ SOBRE LA DAAO	90
4.1. Estudios de inhibición por producto	90

4.2. Modificación química	91
4.2.1. Cinética de inactivación	92
4.2.2. Identificación de los residuos que se oxidan.....	94
4.2.3. Determinación funcional de los residuos que se oxidan.....	96
5. MECANISMO QUÍMICO	98
5.1. Estudios de variación de pH	98
5.2. Modificación química de residuos de DAAO.....	102
5.2.1. Modificación de tirosinas.....	102
5.2.2. Modificación de histidinas con DEP.....	103
5.2.2.1. Cinética de inactivación	103
5.2.2.2. Especificidad de la reacción	104
5.2.2.3. Efecto del pH sobre la inactivación de DAAO por DEP	106
5.2.2.4. Extensión de la modificación. Cálculo del número de histidinas esenciales	107
5.2.2.5. Estudios de protección.....	108
5.2.3. Modificación de triptófanos con NBS	110
5.2.3.1. Cinética de inactivación	110
5.2.3.2. Extensión y especificidad de la modificación	111
5.2.3.3. Estudios de protección.....	116
5.2.3.4. Estudios de la integridad y la dimerización de la DAAO modificada	117
5.2.4. Modificación de otros residuos de DAAO.....	119
APÉNDICE	121
DISCUSIÓN.....	132
1. PURIFICACIÓN Y PROPIEDADES MOLECULARES DE DAAO	133
2. EFECTO DEL H ₂ O ₂ SOBRE LA DAAO	134
3. MECANISMO QUÍMICO	136
3.1. Estudios de pH	136
3.2. Identificación de un residuo esencial de histidina	137
3.3 Identificación de un residuo esencial de triptófano	139
3.4. Modelo propuesto	140
CONCLUSIONES	144
BIBLIOGRAFÍA	146

INTRODUCCIÓN

1. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

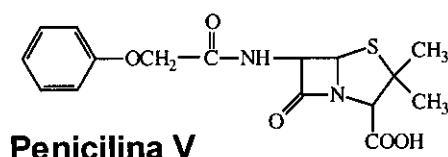
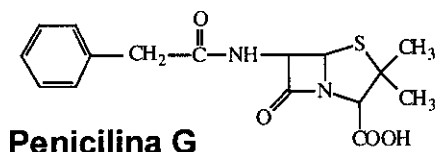
1.1. Antecedentes históricos

El aprovechamiento por el hombre de estrategias defensivas desarrolladas por otros organismos a lo largo de millones de años sigue siendo actualmente un elemento principal en la lucha antibacteriana. La capacidad desarrollada por algunos hongos de sintetizar inhibidores de la síntesis de pared en bacterias es uno de los primeros capítulos en una larga historia de lucha por la supervivencia en la que el hombre ha irrumpido muy recientemente.

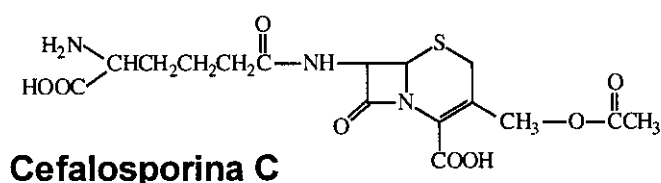
Ya en el año 1877, Pasteur y Joubert señalaron que los cultivos bacterianos se arruinaban con frecuencia por el crecimiento excesivo de hongos, y los microbiólogos pronto reconocieron que un microorganismo podía inhibir el crecimiento de otro por secreción de sustancias tóxicas, si bien la mayor parte también eran tóxicas para animales y se les prestó poca atención. En 1928, en el hospital St. Mary de Londres, Fleming observó que uno de sus cultivos de estafilococos se había contaminado con un hongo y que las bacterias cercanas a las colonias de hongo se lisaban. Fleming notó, además, que el caldo filtrado en el que había crecido el hongo tenía un potente efecto letal sobre varios microorganismos, fundamentalmente gram-positivos, y no era tóxico para animales (Fleming, 1929). El principio activo recibió el nombre de penicilina por ser el hongo productor perteneciente al género *Penicillium*. La aplicación del filtrado en heridas infectadas resultó poco exitosa por la baja concentración de penicilina y su pobre estabilidad. Este hecho unido al descubrimiento del poder antibiótico de las sulfamidas desviaron el interés de las observaciones de Fleming hasta que en 1938, Chain y Falk aislaron en el laboratorio de Florey una muestra bruta de penicilina del hongo *Penicillium notatum* y comprobaron su espectro antibacteriano, sus propiedades químicas y su poca toxicidad en ratones. Con el fin de realizar un estudio clínico, cultivaron el hongo a gran escala necesitando cien litros de caldo para obtener la penicilina necesaria para un día de tratamiento en el hombre. Tan bajo rendimiento les obligaba a recuperar el antibiótico extrayéndolo nuevamente de la orina de los enfermos tratados. Los primeros pacientes muy graves se trataron con éxito en 1941, pero la Segunda Guerra Mundial afectó a todas las esferas de producción en Inglaterra y no se dispuso de los recursos necesarios para la producción a gran escala de penicilina.

En Estados Unidos se desarrolló entonces un programa amplio de investigación que permitió, al final de la guerra, disponer de procedimientos de producción y purificación del antibiótico, así como de estudios clínicos extensos. Se había comprobado que *Penicillium chrysogenum* era una fuente más rica que *P. notatum* y la producción aumentó notablemente al obtener por irradiación con rayos X un mutante de *P. chrysogenum* que se cultivó en extractos de maíz producidos como intermediarios en la industria del aguardiente de maíz. Desde el inicio se observó que la penicilina producida en Estados Unidos era ligeramente diferente a la obtenida en Inglaterra y más tarde se comprobó que la estructura de la penicilina dependía de la cepa usada, así como de la composición del medio de cultivo. Las dos penicilinas más útiles obtenidas de esta forma son la **penicilina G** o benzilpenicilina, administrada normalmente por vía parenteral por su inestabilidad en medio ácido y su pobre absorción intestinal, y la

penicilina V o fenoximetilpenicilina, estable en medio ácido y administrable por vía oral.



Mientras, en el laboratorio de Florey, en Oxford, Abraham y Newton (1961) habían aislado tres antibióticos diferentes del hongo *Cephalosporium acremonium*. Uno de ellos era la penicilina N, otro resultó ser un esteroide que denominaron cefalosporina P, activo sólo frente a gram-positivos y relacionado con el ácido fusídico, y el tercero recibió el nombre de cefalosporina C y mostraba un espectro similar al de la penicilina N, aunque era menos activo. La propiedad más interesante de la cefalosporina C era su actividad frente a bacterias productoras de penicilinasas. Estos investigadores aislaron con éxito el núcleo heterocíclico de la cefalosporina C, el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) y demostraron que era posible elaborar nuevos antibióticos semisintéticos de amplio espectro uniéndole diferentes cadenas laterales. Adicionalmente, se aisló de algunas especies de estreptomicetos la cefamicina C (Stapley y col., 1972), la cuál posee en la posición 7 del núcleo cefem, además de la cadena de aminoácido, un grupo metoxi, lo que le confiere una mayor resistencia al ataque de β -lactamasas.



1.2. Biotransformación de penicilinas y cefalosporinas

Los antibióticos β -lactámicos actúan bloqueando el centro activo de un grupo de enzimas involucradas en los primeros estadios de la construcción de la pared bacteriana que reciben el nombre de Proteínas de Unión de Penicilinas (Penicillin Binding Proteins, PBP's). Algunas bacterias se han adaptado produciendo β -lactamasas (penicilinasas y cefalosporinasas), enzimas que catalizan la ruptura del anillo β -lactámico, evitando así su posterior acción sobre las PBP's. Otro mecanismo de defensa ha sido la expresión de PBP's modificadas, con baja afinidad por penicilina y capaces de llevar a cabo su función incluso en presencia de concentraciones relativamente elevadas del antibiótico.

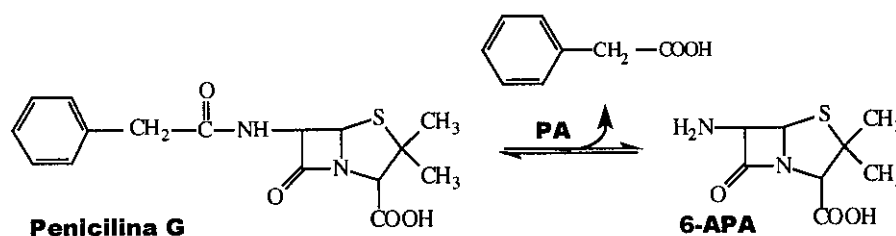


Figura 1. Biotransformación de penicilina G en 6-APA

La proliferación entre las especies bacterianas patógenas de cepas resistentes a las penicilinas naturales ha hecho necesaria la búsqueda de nuevas moléculas capaces de sortear los mecanismos de defensa mencionados. La modificación de la cadena lateral de penicilinas y cefalosporinas ha sido una herramienta muy eficaz en el desarrollo de nuevos fármacos con espectros de actividad y estabilidades significativamente mejoradas.

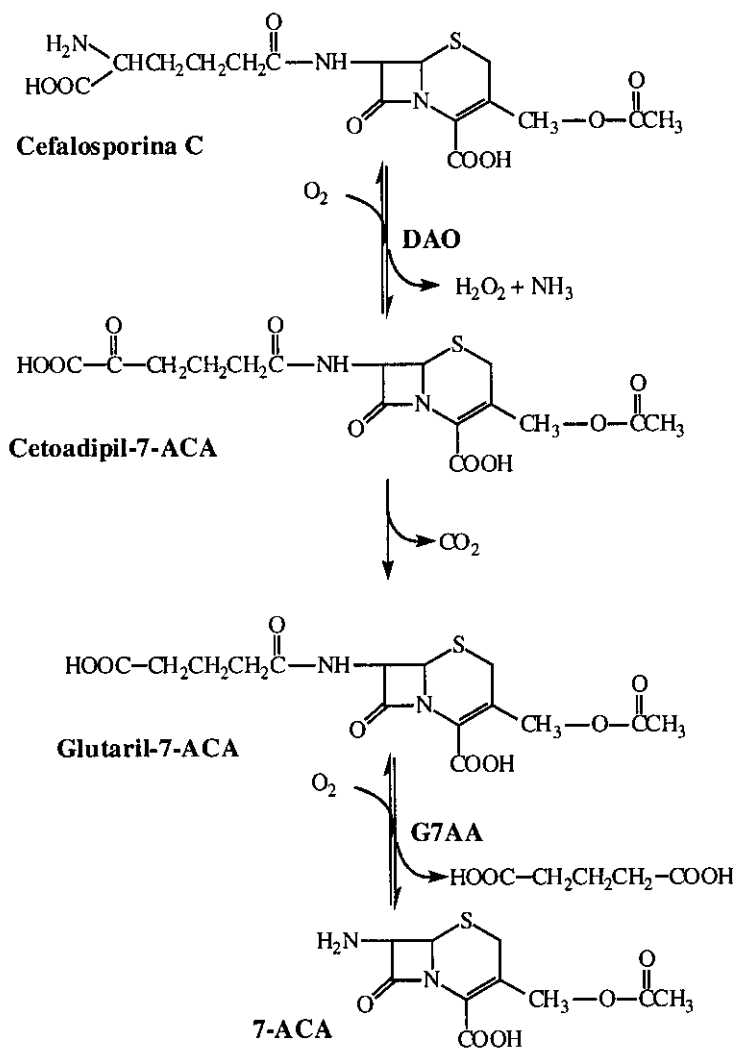
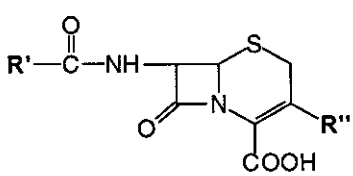
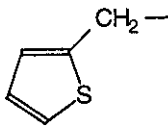
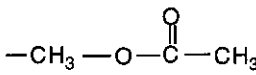
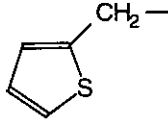
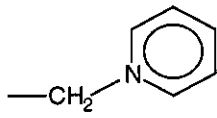
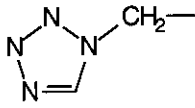
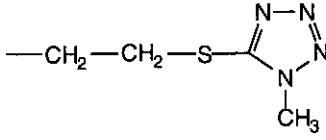
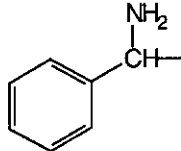
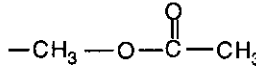
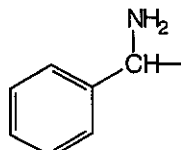

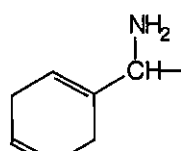

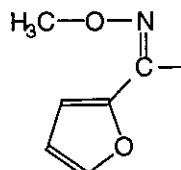
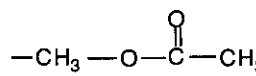


Figura 2. Biotransformación de cefalosporina C en 7-ACA

El primer paso en la obtención de estas penicilinas y cefalosporinas semisintéticas es la escisión de la cadena lateral para dejar el núcleo heterocíclico, es decir, el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) o el 7-aminocefalosporánico (7-ACA). Si bien en el primer caso se detectaron hace tiempo (Sakaguchi y Murao, 1950; Batchelor y col., 1959) **penicilina acilasas** (PA) capaces de llevar a cabo eficazmente la reacción en ambos sentidos (Figura 1), en el segundo caso todavía no disponemos de una cefalosporina C acilasa aplicable industrialmente a la obtención de 7-ACA.

Tabla 1. Estructura de algunas de las cefalosporinas semisintéticas más importantes.

		
	R'	R''
Cefalotina		
Cefaloridina		
Cefazolina		
Cefaloglicina		
Cefalexina		
Cefradina		
Cefuroxima		

La eliminación del resto α -aminoadipilo, cadena lateral de la cefalosporina C, se ha conseguido por la vía química, por reacción con PCl_5 o cloruro de nitrosilo (Abbott, 1976), o bien enzimáticamente (Gilbert et al. 1972; Mazzeo y Romeo, 1972) en dos etapas usando **D-aminoácido oxidasa** (DAAO) y **glutaril-7-ACA acilasa** (G7AA) (Figura 2). La primera enzima (DAAO) oxida la cadena lateral a α -cetoadípico, que sufre una descarboxilación espontánea dando lugar a glutárico, el cuál es reconocido por la segunda enzima (G7AA) que escinde esta cadena dejando el 7-ACA libre y disponible para posteriores modificaciones encaminadas a la obtención de nuevas moléculas semisintéticas con propiedades farmacológicas mejoradas (Tabla 1).

Alternativamente, también se han obtenido cefalosporinas a partir de penicilinas mediante una serie de reacciones químicas o enzimáticas que expanden el anillo de tiazolidina (Fujii y col., 1976), obteniendo así cefalosporinas con una cadena lateral reconocible por penicilina acilasas, que rinden ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA), posteriormente acilado por los métodos comunes para la obtención de penicilinas semisintéticas.

2. FLAVOPROTEINAS

2.1. Características generales de las flavoenzimas

Una flavoproteína es una apoenzima que, junto a su cofactor (FMN, FAD o derivados) más o menos fuertemente unido, cataliza una reacción generalmente de oxido-reducción en la que uno o dos electrones de un dador son transferidos transitoriamente al núcleo de isoaloxacina del cofactor y posteriormente a un aceptor de electrones.

Se recomienda (Bright y Porter, 1975) el uso del término *oxidasa* para aquellas oxido-reductasas que usan el O_2 como aceptor electrónico. Todos los electrones retirados del dador son transferidos al O_2 para formar alguno de sus productos de reducción: O_2^- ; H_2O_2 ; o H_2O . Con la excepción de las metaloflavoproteín oxidasas, que forman ion superóxido, la mayoría de las oxidasas conocidas siguen la estequiometría mostrada en la Figura 3.



Figura 3. Reacción general de las oxidasas

El conocimiento que hoy existe acerca de las oxidasas no es tan profundo como cabría esperar de acuerdo con el volumen de trabajo dedicado. Esto se debe principalmente a tres razones. En primer lugar, exceptuando la monoamino oxidasa (MAO; E.C.1.4.3.4), no se conoce con certeza el papel fisiológico de ninguna oxidasa, y

las posibles funciones adjudicadas a algunas son de poca relevancia metabólica. Además, aunque las reacciones catalizadas son altamente exergónicas termodinámicamente, ninguna de ellas, con la excepción de la piruvato oxidasa (E.C.1.2.3.3), está acoplada a la síntesis de ATP. Por último, la ausencia de datos de cristalografía de Rayos X de alguna oxidasa ha venido dificultando estudios mecanísticos. No obstante, como en todas las enzimas que requieren un cofactor, los estudios modelo dirigidos a los mecanismos cinético y químico son muy plausibles.

La **flavina** en su estado totalmente oxidado tiene la estructura que muestra la Figura 4.

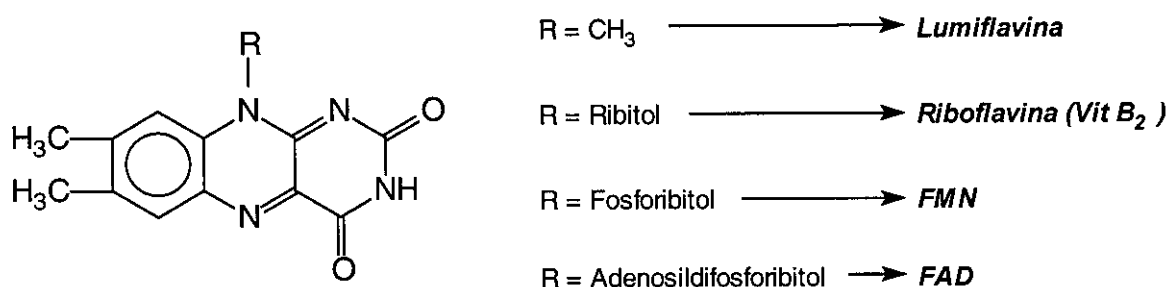


Figura 4. Estructura de la flavina

El núcleo flavínico existe en tres estados redox, cada uno de los cuáles puede encontrarse en tres estados de ionización. Aunque las apoenzimas unen preferentemente ciertos estados redox y de ionización, los equilibrios que podemos encontrar en el intervalo de pH en el que estas retienen su actividad son los que muestra la Figura 5.

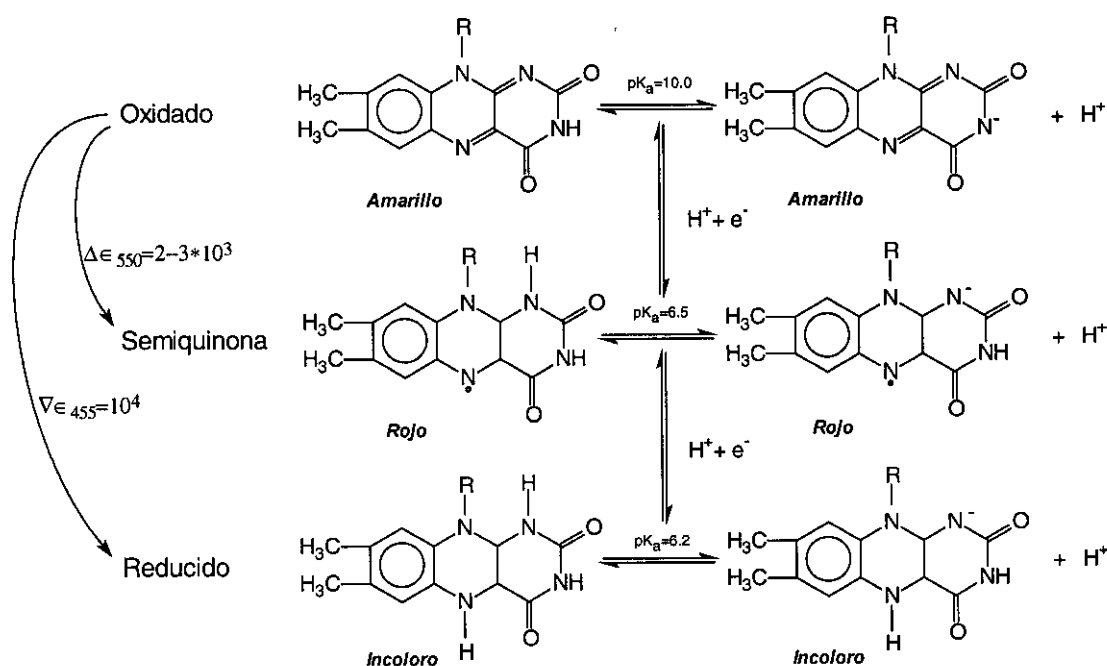


Figura 5. Estados redox de la flavina con sus ionizaciones

Si bien los estados completamente oxidado y completamente reducido son generalmente intermediarios catalíticos obligados, las semiquinonas (que se pueden producir por titulación parcial con ditionitrocompuestos o fotoquímicamente en presencia de EDTA), no parecen serlo en la oxidación de sustratos fisiológicos, aunque no se han podido descartar complejos entre sustrato y flavina como intermediarios de vida corta. El gran descenso de absorbancia en el intervalo 450-460 nm que acompaña a la reducción plena de la flavina, así como la absorción a 550 nm característica del intermediario $Er \cdots P_1$ en las reacciones de aminoácido oxidasas, son armas potentes en el estudio de estas reacciones.

2.2. Estudio de las reacciones catalizadas por oxidasas

Las flavoprotein oxidasas ofrecen grandes posibilidades para el estudio de su mecanismo cinético gracias a tres características fundamentalmente :

- El ciclo catalítico es divisible en dos semireacciones (reductiva y oxidativa).
- La flavina es una sonda espectrofotométrica intrínseca.
- El electrodo de oxígeno ofrece datos de gran precisión.

Las tres oxidasas más estudiadas son la glucosa oxidasa y las D- y L-aminoácido oxidasas. Su mecanismo cinético se ha estudiado siguiendo los siguientes pasos :

1. Estudios cinéticos en estado estacionario. Determinación de constantes macroscópicas.
2. Estudios en estado pre-estacionario de las dos semireacciones por separado. Determinación de constantes microscópicas.
3. Comparación de los resultados de los pasos anteriores, establecimiento de un probable mecanismo cinético (Figura 6) y comprobación por simulación en ordenador.

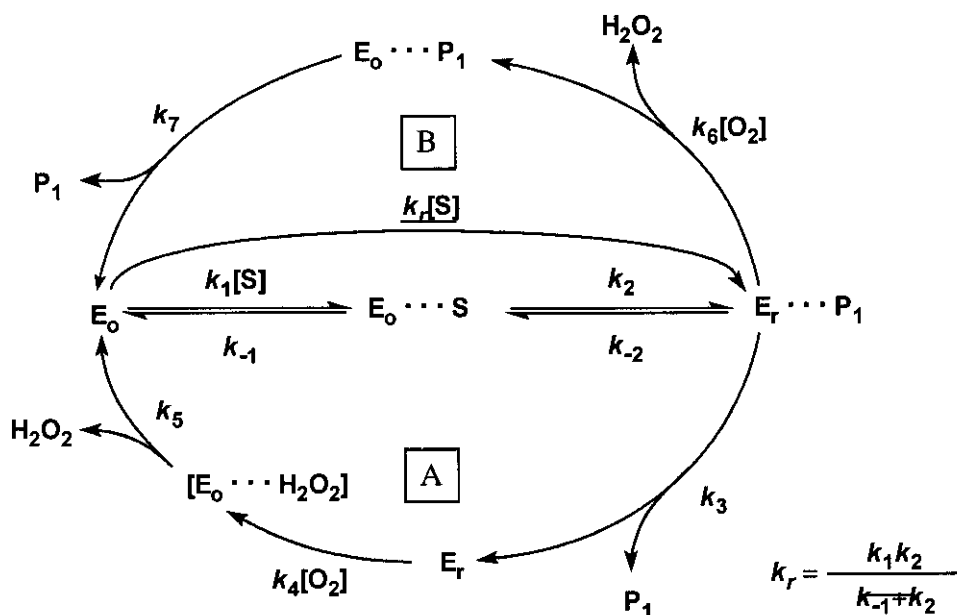


Figura 6. Mecanismo cinético general de flavooxidasas

3. D-AMINOÁCIDO OXIDASAS

3.1. Distribución, localización y papel fisiológico

Desde los primeros informes de detección de actividades D- y L-aminoácido oxidasa por Krebs (1935; 1951) en diversos microorganismos y tejidos animales, se han publicado varias revisiones sobre estas enzimas (Meister y Wellner, 1963; Neims y Hellerman, 1970; Yagi, 1971; Bright y Porter, 1975) y se ha detectado su actividad en un número creciente de organismos. La D-aminoácido oxidasa está ampliamente distribuida en eucariotas. Su actividad ha sido detectada en peroxisomas de mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces (Konno y Yasumura, 1981). En los mamíferos está principalmente localizada en el riñón (peroxisomas de células de los túbulos proximales) (Angermuller, 1989), en el hígado (peroxisomas de hepatocitos) (Perotti y col., 1987) y en el encéfalo (microperoxisomas de células gliales de Bergman y astrocitos del cerebelo) (Horiike y col., 1987). Entre los invertebrados, se ha encontrado en hepatopáncreas de moluscos (Blanschko y Hawkins, 1952). También se han purificado las enzimas del alga *Chlorella vulgaris* (Pistorius y Voss, 1977), de los hongos filamentosos *Neurospora crassa* (Rosenfeld y Leiter, 1977) y *Fusarium solani* (Isogai y col., 1990) y de las levaduras *Candida utilis* (Zwart y col., 1983), *Trigonopsis variabilis* (Kubicek-Pranz y Röhr, 1985) y *Rhodotorula gracilis* (Simonetta y col., 1987). La enzima de riñón de cerdo fue la primera en ser aislada y estudiada, y más recientemente se ha obtenido en forma pura la de *Rhodotorula gracilis*, cuyas propiedades se han investigado extensamente.

Los informes antiguos de la presencia de D- y L-aminoácido oxidasas en bacterias (Krebs, 1951; Stumpf y Green, 1944; Stumpf y Green, 1946) no han sido confirmados como tampoco se han aislado las supuestas enzimas. Debe tenerse en cuenta que estos informes corresponden a estudios realizados con homogeneizados o preparaciones enzimáticas en las primeras etapas de purificación, en los que el tipo de mecanismo no fue profundamente investigado. En la actualidad no está claro si se trata de verdaderas oxidasas, o bien de aminoácido deshidrogenasas unidas a membrana que usan el oxígeno como aceptor electrónico final a través de la cadena respiratoria. De hecho, este último mecanismo se ha propuesto para la D-alanina deshidrogenasa de *E.coli* (Olsiewski y col., 1980; Jones y Venables, 1983) y para la L-aminoácido 'oxidasa' de *Proteus mirabilis* (Pelmont y col., 1972).

El papel fisiológico de la DAAO es objeto de debate en la actualidad. Su conservación a lo largo de la evolución indica que esta enzima debe desempeñar una función importante, si bien su presencia en todos los animales superiores contrasta con la rareza en los mismos de sus sustratos, los D-aminoácidos. Su localización en peroxisomas, donde coexiste con otras enzimas involucradas en la β -oxidación de ácidos grasos y con la catalasa (Lazarow y de Duve, 1976; Usuda y col., 1991) puede justificarse por ser el citotóxico peróxido de hidrógeno uno de los productos de las reacciones de oxidasas pero podría señalar una implicación metabólica.

Las investigaciones sobre la función biológica de la D-aminoácido oxidasa han seguido dos líneas fundamentalmente. La primera sostiene que su papel es metabolizar D-aminoácidos, encontrados en el plasma humano y murino, y cuyos niveles en los

tejidos se encuentran incrementados en la vejez y en las enfermedades renales (Curti y col., 1992). De hecho en ratones mutantes que carecen de DAAO se encuentran niveles incrementados de D-aminoácidos en varios órganos y concretamente de D-alanina y D-metionina en la orina. Si bien la D-metioninuria era causada por contener la dieta de estos ratones un suplemento de DL-metionina (desaparecía al eliminar este suplemento de la dieta), en el caso de la D-alanina se pudo demostrar que provenía de las bacterias intestinales (sus niveles descendían al administrar a los ratones antibióticos para destruir la microflora intestinal) (Konno y col., 1988b; Konno y col., 1989; Nagata y col., 1989; Konno y col., 1988a; Konno y col., 1990). Estas evidencias apuntan a un papel en el metabolismo de D-aminoácidos, si bien los bajos niveles de estos compuestos en los tejidos contrastan con el alto valor de K_M de la enzima para ellos. No obstante, la hipótesis de que la DAAO sea una enzima desintoxicante (D'Aniello y col., 1993a; D'Aniello y col., 1993b) se ve debilitada por el hecho de que la mayor parte de los D-aminoácidos no son tóxicos (Harper y col., 1970) y su administración en elevadas dosis resulta en su excreción en la orina, si bien son parcialmente metabolizados (Stegink y col., 1980; Lehmann y col., 1983). El *aprovechamiento* de los D-aminoácidos, más que su *eliminación*, podría ser la finalidad de la existencia abundante y ubicua de la DAAO. Aunque los D-aminoácidos se han considerado compuestos raros en animales (Corrigan, 1969), se han encontrado niveles significativos en diversos organismos y se encuentran en alimentos que ingerimos frecuentemente (Man y Bada, 1987). La cantidad de D-serina endógena hallada en el cerebro humano ha llevado al establecimiento de la hipótesis de su papel en la modulación de la neurotransmisión actuando en algún paso del metabolismo de neurotransmisores (Fukui, 1996). Los L-aminoácidos de proteínas alimentarias son racemizados por el calor durante la cocción y también en las condiciones alcalinas de procesos de preparación de alimentos. También están presentes en cantidades significativas en alimentos preparados por fermentación microbiana (Brückner y Hausch, 1989). Algunos D-aminoácidos son utilizados en lugar de los L-aminoácidos esenciales por los mamíferos (Meister, 1965). Dado que los mamíferos no disponen de una racemasa que catalice la conversión directa de D-aminoácidos a los correspondientes isómeros L, se cree que esta transformación se realiza en dos pasos, siendo el primero una desaminación oxidativa a 2-oxoácidos por la DAAO y el segundo una reaminación asimétrica por una transaminasa para formar los L-aminoácidos. De ser cierto lo anterior, los ratones ddY/DAAO⁻, que carecen de actividad DAAO no podrían utilizar D-aminoácidos y, de hecho, se demostró que no podían utilizar D-fenilalanina en lugar del isómero L, pero sí podían usar el fenilpiruvato (el 2-oxoácido intermediario en la conversión de D-fenilalanina) (Konno y Yasumura, 1984), resultados que apoyan la hipótesis de la conversión en dos pasos e indican que la DAAO es una enzima indispensable en el metabolismo de D-aminoácidos. No favorece a esta hipótesis el hecho de que no se ha corroborado la inducibilidad de la enzima por D-aminoácidos en mamíferos, inicialmente descrita por Lyle y Jutila (1968). En levaduras, no obstante, sí se ha demostrado la inducción de DAAO por D-aminoácidos añadidos al medio (Simonetta y col., 1989).

La segunda línea de investigación considera que los sustratos fisiológicos de la DAAO no son D-aminoácidos, sino productos de la reacción de aminas con el glioxilato. Esta hipótesis se vio apoyada por la observación (Hamilton, 1985; Hamilton y col., 1979) de que *N*-alquil D-aminoácidos y la D-prolina son buenos sustratos para la enzima. De hecho, la DAAO de riñón de cerdo cataliza el consumo de oxígeno en presencia de concentraciones relativamente altas de glioxilato y cisteamina y la

actividad es mayor al pH fisiológico de 7.4 que al pH óptimo observado con la mayor parte de los sustratos (8.3). El sustrato real sería entonces el complejo de ambas moléculas: el tiazolidin-2-carboxilato. La reacción con este sustrato ha sido confirmada en otros laboratorios (Fitzpatrick y Massey, 1982c; Simonetta y col., 1987), si bien su significación fisiológica sigue siendo controvertida.

Adicionalmente, Moreno (1986) ha propuesto que los hidrógenos α de los residuos L-aminoacídicos dispuestos en lámina β en las proteínas de membrana son los verdaderos sustratos dado que sus estructuras (estereoposición de cargas y cadenas laterales) se asemejan a las de los D-aminoácidos. De esta forma, los productos serían proteínas hidroxiladas en carbonos α por incorporación de uno de los átomos de oxígeno, siendo el otro reducido a agua. Alternativamente, este mismo autor considera la posibilidad de que la DAAO, y posiblemente otras monooxigenasas, tengan una actividad hidroperóxido-sintetasa y los productos sean hidroperóxidos de carbonos α y otra molécula reducida distinta al agua.

3.2 Enzima de riñón de cerdo

La purificación de la DAAO de riñón de cerdo se basa en el método original de Kubo (1958), posteriormente modificado por Brumby y Massey (1968) y después mejorado mediante la adición de una cromatografía en DEAE-Sephadex por Curti y col. (1973). La enzima puede aislarse como apoproteína, holoenzima o complejo holoenzima-benzoato. El benzoato, un pseudosustrato e inhibidor competitivo, se usa para estabilizar la enzima durante la purificación y puede ser retirado por el procedimiento de Brumby y Massey (1968). La apoproteína se obtiene por diálisis prolongada contra una solución concentrada de bromuro potásico, dado que el bromuro debilita las interacciones entre la flavina y la apoproteína (Massey y Curti, 1966).

La holoenzima catalíticamente activa es un monómero que contiene una molécula de FAD unido no covalentemente y con un peso molecular de 39,600 según electroforesis en SDS y análisis de aminoácidos (Curti y col., 1973) y más tarde confirmado por la secuencia de aminoácidos (Ronchi y col., 1982a). El punto isoelectrico determinado experimentalmente es de 7.2 (Yagi y Ohishi, 1972), un valor coherente con el teórico calculado a partir de los pK 's de las cadenas laterales (7.0-7.2) (Ronchi y col., 1982a).

Se ha determinado la constante de disociación del complejo FAD-apoenzima, siendo su valor de 2.2×10^{-7} M (Massey y Ganther, 1965). La unión del FAD a la apoproteína es un proceso bifásico (Massey y Curti, 1966); la primera fase es rápida y está asociada a un apantallamiento considerable de la fluorescencia flavínica sin aparición de actividad catalítica; la segunda presenta una gran disminución de la fluorescencia proteica, una pequeña disminución adicional de la fluorescencia flavínica y la aparición de actividad catalítica. Todos los cambios lentos de la segunda fase presentan velocidades similares y parecen estar asociados a un cambio conformacional de la enzima. La porción adenínica del FAD juega un importante papel en la unión a la

apoproteína (Chassy y McCormick, 1965), si bien el FMN se ha descrito como inhibidor competitivo en la unión del FAD (Walaas y Walaas, 1956).

Existen tres formas espectrales de la enzima: completamente oxidada, completamente reducida y parcialmente ($1e^-$) reducida. Otras formas espectrales de la DAAO formando complejos con diferentes ligandos se han detectado en estudios de estado estacionario y pre-estacionario. Si bien se sabe que la forma ($1e^-$)-reducida es aniónica, existe controversia acerca del carácter iónico de la forma completamente reducida, aunque ya se han aportado evidencias de su naturaleza aniónica (Fitzpatrick y Massey, 1982a; Massey y col., 1984). La Tabla 2 resume las características espectrofotométricas y espectrofluorimétricas de la DAAO de riñón de cerdo, así como de la enzima de *Rhodotorula gracilis*.

La D-aminoácido oxidasa de riñón de cerdo ha sido considerada una flavooxidasa modelo. La forma reducida reacciona rápidamente con el oxígeno, la enzima estabiliza el radical aniónico rojo de la flavina tras fotoreducción en presencia de EDTA. Forma un complejo covalente reversible con el sulfito a través de la posición N(5) de la flavina con una K_d en torno a 3.5×10^{-3} M (Massey y col., 1969a). La apoproteína estabiliza las formas aniónicas benzoquinónicas de 8-mercaptoflavinas, 6-hidroxi flavinas y 6-mercaptoflavinas (Massey y Hemmerich, 1980; Ghisla y Massey, 1986). Como en el caso de otras flavoproteínas, este hecho se ha atribuido a una interacción entre una carga positiva de la proteína (probablemente un residuo de arginina) y la región N(1)-C(2)=O de la coenzima. Esta misma interacción favorecería la transferencia de equivalentes redox a través de la posición N(5) durante la catálisis (Massey y Hemmerich, 1980; Ghisla y Massey, 1986). La reducción de DAAO con borohidruro conduce a la formación de la 3,4-dihidroflavina, quedando la actividad catalítica prácticamente intacta (Massey y col., 1968; Müller y col., 1969). Como ocurre en el resto de las flavooxidases, durante la reacción con el O_2 , no existe evidencia de la formación de radical de oxígeno ni de flavina; la reacción es monofásica con producción directa de H_2O_2 y $FADH_2$ (Massey y col., 1969a; Massey y col., 1969b).

Tabla 2. Características espectrofotométricas y espectrofluorimétricas de las DAAO de riñón de cerdo y de *Rhodotorula gracilis* (Curti y col., 1992).

	<u>DAAO de riñón de cerdo</u>		<u>DAAO de <i>Rhodotorula gracilis</i></u>	
	<u>Estado oxidado</u> <u>(Fl_{ox})</u>	<u>Estado reducido</u> <u>($1,5-H_2Fl_{red}$)</u>	<u>Estado oxidado</u> <u>(Fl_{ox})</u>	<u>Estado reducido</u> <u>($1,5-H_2Fl_{red}$)</u>
$A_{m\acute{a}x}$ (nm)	455,380,274	355,415	455,368,274	350
$A_{m\acute{i}n}$ (nm)	408,315		410,317	
A_{274}/A_{455}	9.5		8.2	
$A_{1cm}^{0.1\%}$ (278)apo	1.95		2.14	
$A_{1cm}^{0.1\%}$ (274)holo	2.85		2.78	
ϵ_{holo} ($M^{-1}cm^{-1}$)	11300 (455 nm)	4100 (355 nm)	12600 (455 nm)	6800 (350 nm)
$F_{m\acute{a}x}$ (nm)	530		530	

$A_{m\acute{a}x}$: máximos de absorbancia
 $A_{m\acute{i}n}$: mínimos de absorbancia
 $F_{m\acute{a}x}$: máximos de fluorescencia

apo : apoproteína
holo : holoenzima
 ϵ : coeficiente de extinción molar

En cuanto a la especificidad de sustrato, la D-prolina es el mejor sustrato para la DAAO a pH 8.5, seguida de aminoácidos hidrofóbicos y neutros (Dixon y Kleppe, 1965a). No se detecta actividad con D-glutamato ni D-aspartato, pero hay una leve actividad frente a algunos aminoácidos básicos (Yagi y col., 1966). La enzima es también activa con glicina (Neims y Hellerman, 1962). Otros compuestos como el ácido tiazolidín-2-carboxílico, nitroalcanos y cloroderivados de aminoácidos son sustratos de la DAAO (Hamilton y col., 1979; Fitzpatrick y Massey, 1982c; Porter y col., 1972; Walsh y col., 1973; Walsh y col., 1971).

La DAAO de riñón de cerdo muestra un elevado nivel de especificidad por el oxígeno como aceptor final de electrones, siendo muy bajo el rendimiento de otros aceptores como el azul de metileno, ferricianuro, 2,6-diclorofenolindofenol, metasulfato de fenacina (Rao y col., 1972) o iodonitrotetrazolio, y nulo con citocromo *c* o NAD⁺ (Dixon y Kleppe, 1965a).

Además de los sustratos, la enzima es capaz de unir una gran variedad de ácidos carboxílicos alifáticos y aromáticos. Desde los primeros estudios de DAAO (Dixon y Kleppe, 1965a), se detectó el efecto inhibitor sobre la actividad catalítica de ácidos alifáticos de cadena larga saturada, así como de hidroxiaácidos y cetoácidos, siendo el nivel de inhibición dependiente de la longitud de la cadena. En algunos casos, la inhibición parecía ser competitiva. Los complejos entre la enzima y los ácidos carboxílicos alifáticos y aromáticos dan lugar a perturbaciones espectrales con bandas de absorción típicas de transferencia de carga para algunos de los compuestos. El benzoato se une a la enzima con una K_d de 3×10^{-6} M a pH 8.5 y una estequiometría de 1:1 (Massey y Ganther, 1965). Usando D-alanina como sustrato, se observa una K_i de 1.3×10^{-5} M (Yagi y col., 1959). Los cambios espectrales observados durante la unión del benzoato son más pronunciados en la región de 480-520 nm y se interpretan como un cambio conformacional de la enzima debido a la destrucción por el ligando de puentes de hidrógeno entre el núcleo de isoaloxacina y un grupo amino cargado de la proteína. El grupo carboxilato del benzoato, al igual que el del sustrato, parece requerir un grupo positivo en la enzima para unirse. Más recientemente, se ha demostrado la interacción de la enzima con picolinato y nicotinato, inhibidores que, de forma interesante, dan lugar a complejos de transferencia de carga con la enzima (Nishina y col., 1986).

Algunos L-aminoácidos, como L-norvalina, L-leucina, L-metionina y L-prolina, inhiben en alguna medida a la enzima cuando se usa D-alanina como sustrato (Dixon y Kleppe, 1965a).

La enzima muestra actividad óptima en el intervalo de pH 8.0-9.0 (Dixon y Kleppe, 1965b) y su espectro cambia en el intervalo 7.0-10.0, titulándose un grupo con un pK de 9.4, muy probablemente el N(3)H de la flavina (Quay y Massey, 1977). Las representaciones de Arrhenius de la reacción catalizada muestran claras inflexiones a 12-14°C y a 24°C con D-alanina y D-metionina respectivamente (Massey y col., 1966). Los cambios en la actividad catalítica se han relacionado con variaciones en otros parámetros físico-químicos como la constante de disociación y los espectros visible y ultravioleta. Estos datos son coherentes con una transición dependiente de la temperatura entre dos formas de la enzima, siendo ambas catalíticamente activas, pero con diferentes energías de activación.

Al parecer (Charlwood y col., 1962), la DAAO existe en solución como un equilibrio monómero-dímero-tetrámero e incluso de agregados moleculares superiores. Este equilibrio depende de la concentración de enzima, así como de la forma de enzima (apoproteína, holoenzima, complejo enzima-benzoato, etc.), de la temperatura, el pH y la fuerza iónica (Antonini y col., 1966). Numerosos estudios se han centrado en el modo de autoasociación de la DAAO. Tojo y col. (1985a; 1985b) han establecido que tanto la holoenzima como la apoproteína existen como monómeros cuando se extrapola el peso molecular aparente a concentración proteica cero. Los estudios de dispersión de láser demostraron que en el caso de la apoproteína, el modelo era de asociación secuencial de monómeros con constantes moleculares de asociación idénticas en cada paso (autoasociación isodésmica infinita), mientras que la holoenzima seguía una pauta de dimerización y posterior asociación isodésmica infinita de dímeros. Adicionalmente, este fenómeno de asociación afecta a la actividad catalítica, resultando ser dependientes de la concentración de enzima tanto la unión de inhibidores como el número de recambio (Horiike y col., 1974; Shiga y Shiga, 1972). Estudios en estado estacionario y pre-estacionario (Fitzpatrick y Massey, 1982b) han mostrado que el número de recambio disminuye a la mitad cuando la concentración de enzima se incrementa 600 veces (de 29 nM hasta 17 μ M). Estos resultados han sido explicados como resultado de una diferencia entre monómeros y oligómeros en cuanto a la velocidad de liberación de producto, siendo la tasa de disociación de ligandos del monómero más rápida que la correspondiente a las formas oligoméricas. Esto explicaría velocidades más altas a bajas concentraciones de enzima, a las que predominan los monómeros, y más bajas a concentraciones altas de enzima, a las que las formas oligoméricas son más abundantes.

3.3 Enzima de *Rhodotorula gracilis*

Las levaduras rojas aerobias obligadas del género *Rhodotorula* muestran una serie de características metabólicas peculiares tales como producir glucógeno en la fase de crecimiento exponencial y grandes cantidades de lípidos y pigmentos carotenoides en la fase estacionaria (Mares, 1982), tener un metabolismo de glucosa atípico y una enzima de hidrólisis de citrato (Guerriore y Hanozet, 1970). La composición de la pared es también inusual (Aral y col., 1978).

La DAAO de *Rhodotorula gracilis* es una enzima inducible y la regulación de su expresión ha sido estudiada (Perotti y col., 1991; Simonetta y col., 1989). La mayor inducción se obtiene usando D-alanina y la presencia del isómero L evita la inducción inhibiendo el transporte de D-alanina hacia el interior celular. No obstante, la permeasa específica no es un sistema de transporte inducible por el aminoácido. La enzima se encuentra exclusivamente confinada en la matriz de orgánulos que también contienen catalasa, por lo que han sido considerados peroxisomas. Estos orgánulos (microcuerpos, glioxisomas o peroxisomas) aumentan en volumen y número en las células crecidas en medio con D-alanina. Se ha podido demostrar que la síntesis *de novo* de DAAO en *Rhodotorula gracilis* es inducida específicamente por D-aminoácidos. Aunque este organismo es capaz de utilizar D-alanina como única fuente de carbono y nitrógeno, la máxima expresión de enzima se obtiene usando D-alanina como única fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono.

El método de purificación de la DAAO de la levadura roja *Rhodotorula gracilis* ha sido descrito por Simonetta y col. (1987), quienes posteriormente han mejorado considerablemente el rendimiento del proceso optimizando las condiciones de cultivo de la levadura y consiguiendo extractos celulares con una actividad específica inicial más elevada (Simonetta y col., 1989), y más recientemente han realizado una mejora adicional incluyendo un paso cromatográfico de alta resolución (FPLC) en Mono Q (Pilone Simonetta y col., 1989). A diferencia de la enzima de riñón de cerdo, la de levadura no requiere la adición sobre la mezcla de ensayo de FAD exógeno para alcanzar la velocidad máxima, lo que indica una unión más fuerte entre apoproteína y coenzima. El monómero presenta un peso molecular de 39,000 según electroforesis en SDS y análisis de aminoácidos y contiene una molécula de FAD no covalentemente unido. El cociente A_{274}/A_{455} de la enzima pura es 8.2. El isoelectroenfoco de la holoenzima muestra dos bandas activas en tinción de actividad de igual forma que se ha descrito para la enzima de riñón de cerdo. Los puntos isoelectríficos de las dos isoformas son 7.3 y 7.5 (Curti y col., 1992).

La enzima de levadura presenta también las características típicas de flavoproteín-oxidasas, a saber, reactividad rápida de la forma reducida con el oxígeno, alta afinidad por iones sulfito para dar lugar a un complejo reversible a través de la posición N(5) con una K_d de 110 μM a 17°C y pH 7.5 y la estabilización del radical aniónico rojo tras fotoreducción de la enzima en presencia de EDTA y 5-deazariboflavina. No obstante, a diferencia de la enzima de mamífero, la reducción de la DAAO de levadura con borohidruro sódico no lleva a la formación de la 3,4-dihidroflavina (Pilone Simonetta y col., 1989).

La DAAO de levadura muestra una actividad catalítica considerablemente elevada (43250 min^{-1} para D-alanina a 30°C (Pollegioni y col., 1992)), es estrictamente específica hacia los D-aminoácidos y su especificidad de sustrato es algo diferente de la hallada en la enzima de riñón de cerdo. Los estudios cinéticos preliminares (Simonetta y col., 1987) muestran que su mejor sustrato es la D-metionina, seguida de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos. La enzima muestra una pobre actividad frente a aminoácidos básicos y es completamente inactiva con D-aspartato y D-glutamato. El ácido D-L-tiazolidín-2-carboxílico también actúa como sustrato.

La unión del benzoato a la enzima es menos fuerte que en el caso de la enzima de riñón de cerdo, como demuestran los valores más altos de K_d (245 frente a 3 μM) y K_i (360 μM usando D-fenilglicina como sustrato frente a 13 μM con D-alanina) (Pilone Simonetta y col., 1989). La curva de pH con D-alanina como sustrato y una concentración de oxígeno de 0.23 mM muestra un máximo entre 8.0 y 8.6 (Curti y col., 1992).

La idoneidad de la enzima de levadura para la biotransformación de cefalosporinas en la industria farmacéutica, así como la carencia de datos acerca de su centro activo y su mecanismo cinético hacen muy aconsejable su estudio en profundidad usando como referencia la extensamente estudiada enzima de riñón de cerdo.

3.4. Estudios de la estructura primaria y del centro activo

La secuencia de aminoácidos de la D-aminoácido oxidasa de riñón de cerdo fue la primera en ser publicada de forma parcial (Yagi y col., 1974) y total (Ronchi y col., 1982a). La enzima contiene 347 residuos, siendo de metionina y leucina los extremos N- y C-, respectivamente. De las 5 cisteínas presentes, 4 están en la segunda mitad de la cadena, mientras que la otra, en posición 18, está incluida en una secuencia altamente hidrofóbica. El polipéptido no presenta puentes disulfuro. Los residuos implicados en el centro activo se distribuyen principalmente en la segunda mitad de la secuencia, si bien el motivo -Gly-X-Gly-Y-Z-Gly- que, de acuerdo con la estructuras tridimensionales disponibles de otras flavoproteínas, forma parte del dominio de unión del nucleótido, se encuentra en uno de los 4 plegamientos $\beta\alpha\beta$ de la proteína, en el extremo N-terminal.

Las estrategias seguidas para la identificación de residuos esenciales en la unión de sustrato y cofactor y en la construcción de un mapa del centro activo han sido el uso de modificadores químicos, análogos de coenzima y la mutagénesis dirigida.

La desaparición parcial o total de actividad tras la modificación covalente de diferentes tipos de residuos y la protección ejercida por el benzoato condujeron a la identificación de los siguientes residuos :

- **His²¹⁷**, implicada en la abstracción del protón α del sustrato (Nishino y col., 1980; Swenson y col., 1983; Swenson y col., 1984),
- una **arginina**, situada cerca del sitio $N^1-C^2=O$ de la flavina y que estabiliza la forma aniónica de la coenzima reducida (Nishino y col., 1980; Ferti y col., 1981; Fitzpatrick y Massey, 1983; Vanoni y col., 1987),
- **Lys²⁰⁴**, como pareja iónica del carboxilo del sustrato (Swenson y col., 1982)
- **Tyr⁵⁵** o **Tyr²²⁴**, cercana al grupo amino del sustrato, actuando como base general durante la catálisis (Ronchi y col., 1980; Rudie y col., 1980; Swenson y col., 1982), y
- **Met¹¹⁰**, implicada en la ruptura del supuesto complejo covalente entre el N5 de la flavina y el carbanión derivado del sustrato (D'Silva y col., 1986; D'Silva y col., 1987).

También los residuos **Tyr²²⁸** e **His³⁰⁷** han sido relacionados con el centro activo usando propargilglicina, un sustrato suicida de la D-aminoácido oxidasa que produce derivados de la enzima con algo de actividad residual (Ronchi y col., 1982b; Marcotte y Walsh, 1978; Miyake y col., 1987).

Los estudios del centro activo de DAAO usando análogos de flavina inicialmente explorados por el equipo de McCormick (McCormick y col., 1964; Chassy y McCormick, 1965) e intensamente explotados por Massey y Hemmerich (1980) aportaron nuevos datos sobre el entorno del cofactor. Usando 2-mercapto, 4-mercapto, 6-hidroxi, 6-azido, 6-mercapto, 6-tiocianato, 8-hidroxi, 8-mercapto y 8-halógeno derivados se pudo deducir que las posiciones 4 y 8 del núcleo de isoaloxacina están expuestas al disolvente (Ghisla y Massey, 1986). De la exposición al disolvente de la posición 5 se sabía ya por su reactividad con sulfito (Massey y col., 1969a). La posición

6 está parcialmente expuesta mientras que la 2 se encuentra completamente enterrada en la holoenzima (Ghisla y Massey, 1986).

Varias observaciones vinieron a apoyar la posibilidad de la presencia de grupos sulfhidrilo en el centro activo de la DAAO. Por una parte, el derivado 6-tiocianato de la flavina se convierte lentamente en 6-mercaptoflavina, lo que hace pensar en la existencia de un grupo -SH en las inmediaciones del sitio C⁶ del cofactor. Por otra parte, la modificación usando maleimidas de un grupo sulfhidrilo produce inactivación de la enzima. La protección ejercida por el AMP frente a esta inactivación indica que el -SH modificado debe estar cerca de la porción adenínica del FAD. Si asumimos una conformación extendida del FAD en la DAAO, como la encontrada en todas las estructuras tridimensionales de flavoproteínas dependientes de FAD descritas (Schirmer y Schulz, 1983; Wierenga y col., 1983; Karplus y Schulz, 1987), las observaciones anteriores conducen a la idea de la presencia de más de un grupo sulfhidrilo en el sitio de unión de FAD de la DAAO.

El uso de la técnica de mutagénesis dirigida por oligonucleótido condujo a resultados en clara contradicción con los obtenidos en estudios por modificación química de residuos. Las sustituciones Tyr⁵⁵→Phe, Met¹¹⁰→Leu, Lys²⁰⁴→Glu, His²¹⁷→Leu y Tyr²²⁴→Phe no parecen afectar significativamente la actividad (Watanabe y col., 1988; Watanabe y col., 1989). Adicionalmente, estos autores sugieren que la Met¹¹⁰ no es un residuo esencial pues está sustituido por Thr en la DAAO humana (Momoi y col., 1988). Sin embargo, las mutaciones Tyr²²⁸→Phe e His³⁰⁷→Leu conducen a una completa inactivación de la enzima.

Ambos enfoques experimentales pueden ser criticados y sólo la resolución de la estructura tridimensional puede asentar la topografía del centro activo de la DAAO porcina. Los estudios de modificación química se realizaron usando agentes marcadores de elevada especificidad, como aminoácidos N-cloro sustituidos, que a menudo modifican un sólo residuo inactivando la enzima. En estos casos se suele asumir que la conformación de la proteína no se afecta significativamente, si bien la introducción de un grupo nuevo, aunque pequeño, podría causar perturbaciones en el entorno del centro activo que amplificarían el efecto inhibitorio primario a través de efectos estéricos o de diferencias en las propiedades químicas del residuo modificado. Esta misma crítica, no obstante, puede hacerse a la mutagénesis dirigida ya que la introducción de cadenas laterales diferentes puede afectar a la arquitectura del centro activo. Adicionalmente, las enzimas mutadas se produjeron en cantidades muy pequeñas y la actividad enzimática se determinó directamente en extractos crudos, lo que puede conducir a observaciones sesgadas como indica la varianza de los parámetros cinéticos publicados (Watanabe y col., 1988; Watanabe y col., 1989). Además, en algunos de los estudios de modificación química, el análisis cinético detallado del mecanismo indicaba la implicación del residuo modificado en un paso catalítico determinado, mientras que en los experimentos con enzima mutada la insuficiencia de enzima impidió tales estudios.

Más recientemente, los resultados obtenidos mediante estudios de modificación química se vieron apoyados por la comparación de la DAAO con la glicolato oxidasa, cuya estructura del centro activo se había resuelto por cristalografía a 2.2 Å (Lindqvist y Branden, 1989) (Figura 7). El centro activo de la glicolato oxidasa muestra una gran similitud con el de la lactato monooxigenasa (Müh y col., 1994) y el flavocitocromo *b*₂

(Xia y Mathews, 1990; Xia y col., 1987). Aunque el grado de homología entre las secuencias de aminoácidos de la DAAO y estas enzimas es bajo, cabe esperar un mapa de centro activo similar al de estas oxidasas. Los residuos detectados en este caso muestran paralelismo con los deducidos para DAAO: Arg²⁵⁷, Tyr²⁴ y Tyr¹²⁹ están implicados en la unión de sustrato, His²⁵⁴ en la abstracción del protón del sustrato, Lys²³⁰ se encuentra cerca del sitio N1-C2=O de la flavina y Arg³⁰⁹ une electrostáticamente el fosfato del FMN. Las principales diferencias afectan a los residuos básicos, que en la glicolato oxidasa juegan un papel diferente al mencionado para la DAAO.

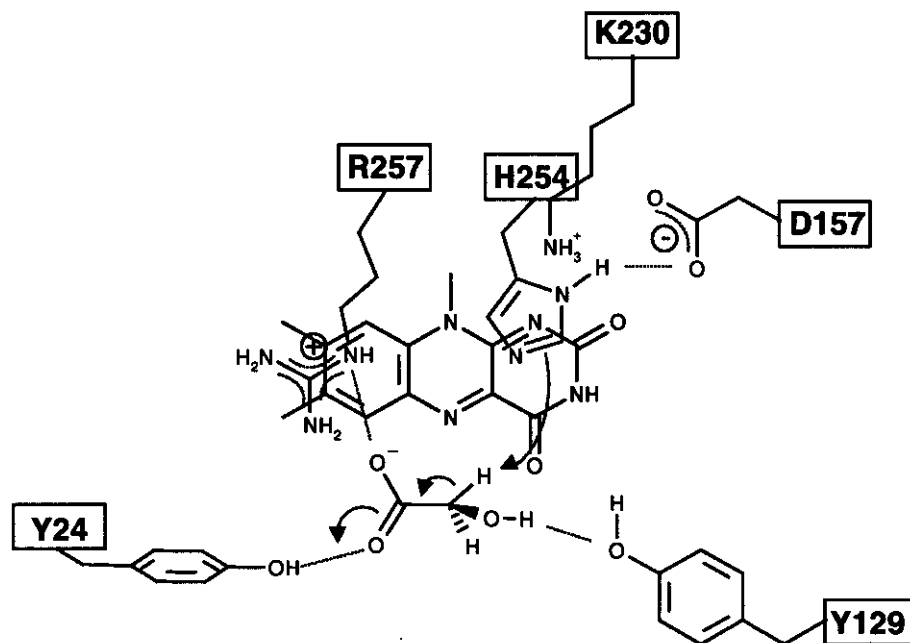


Figura 7. Representación del centro activo de la glicolato oxidasa basada en los datos de cristalografía de rayos X con una resolución de 2.2 Å (Lindqvist y Branden, 1989)

A pesar de los numerosos estudios bioquímicos, espectroscópicos y cinéticos, el mecanismo de la reacción catalizada por la DAAO sigue siendo objeto de controversia. La llamada “hipótesis del carbanión” (Walsh y col., 1973; Ghisla y col., 1979; Curti y col., 1992) expone que la oxidación del sustrato ocurre a través de un intermediario carbaniónico cuya formación sería inducida por una base del centro activo que abstraiera el protón α del sustrato. Otra hipótesis plantea que el sustrato aminoacídico puede ser oxidado por transferencia directa de hidruro a la posición N5 de la flavina bien desde el carbono α (Hersh y Jorns, 1975) o desde el nitrógeno (Miura y Miyake, 1988) del sustrato. No obstante, en ausencia de datos de estructura tridimensional, ninguna de la hipótesis recibió apoyo experimental definitivo.

Finalmente, dos equipos investigadores (Mattevi y col., 1996; Mizutani y col., 1996) han publicado casi simultáneamente la estructura tridimensional del complejo de la D-aminoácido oxidasa de riñón de cerdo con benzoato resuelta por cristalografía de rayos X (Figura 8) y la topografía del centro activo descrita en estas publicaciones entra

en contradicción con los resultados obtenidos en los estudios de modificación química de residuos, de mutagénesis dirigida y de análogos de cofactor.

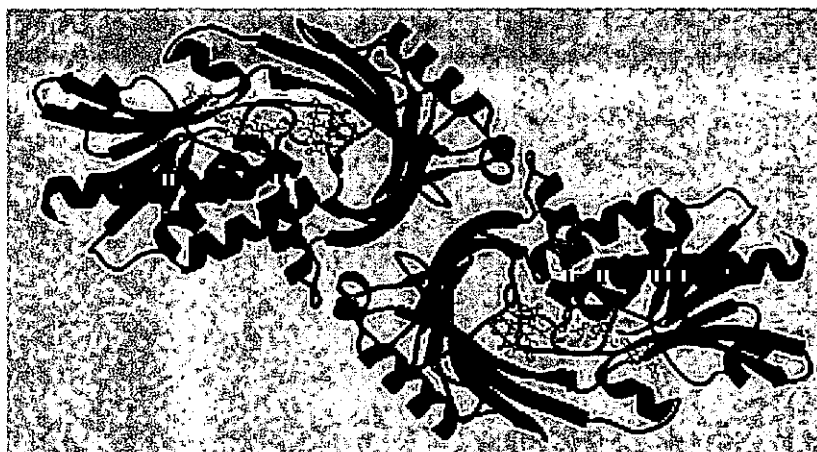


Figura 8. Diagrama MOLSCRIPT del dímero de la DAO de riñón de cerdo. El diagrama se basa en la estructura tridimensional resuelta por cristalografía de rayos X. El dominio de interfaz está coloreado en rojo y el de unión a FAD en azul. Representaciones de varillas del FAD y el benzoato aparecen en amarillo y verde, respectivamente. La región "lazo" que comprende a los residuos 216-228 se muestra en negro (tomado de: Mattevi y col., 1966).

Cada monómero (Figura 9) está integrado por dominios de unión al FAD y de interacción con otro monómero, con una topografía general muy similar a la de la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa.

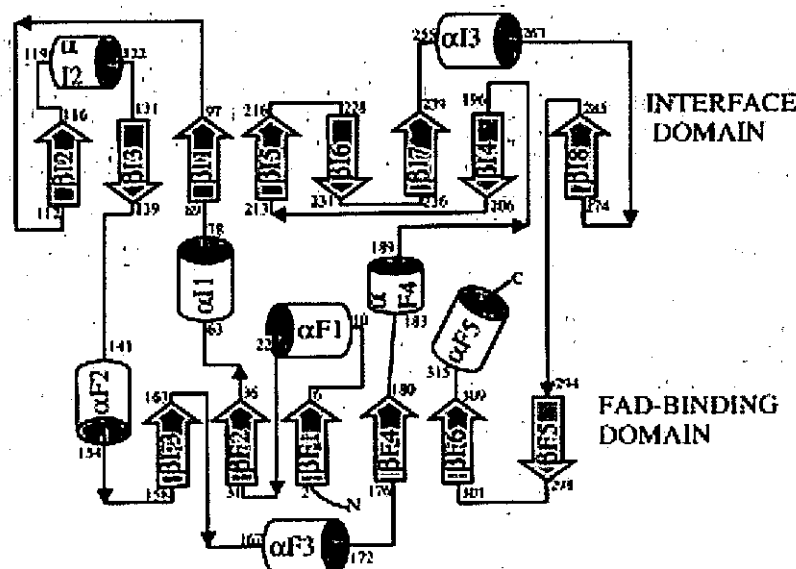


Figura 9. Topografía de estructura secundaria de la DAO de riñón de cerdo. Las hélices α se muestran como cilindros y las láminas β como flechas. Los elementos de estructura secundaria de los dominios de interfaz y de unión a FAD están etiquetados con las letras I y F, respectivamente, seguidas de su número secuencial (tomado de: Mattevi y col., 1966).

El centro activo de la DAAO muestra una sorprendente similitud al del flavocitocromo b2, una flavoenzima no relacionada estructuralmente. De hecho sus centros activos son casi completamente superponibles una vez realizada una transposición especular (Figura 10). Estas enzimas parecen haber sufrido una evolución convergente hacia una arquitectura similar, aunque enantiomérica, para catalizar reacciones similares (oxidación de α -aminoácidos o α -hidroxiácidos), si bien con estereoquímicas opuestas.

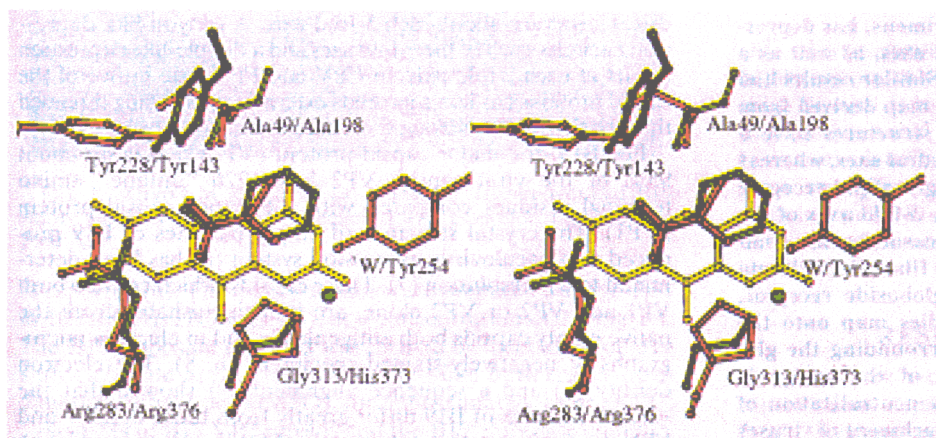


Figura 10. Comparación del centro activo de la DAAO de riñón de cerdo (verde) y la imagen especular del flavocitocromo b2 (rojo). Las coordenadas del flavocitocromo se transformaron aplicando la especulación coplanar del anillo de flavina. Las esferas representan moléculas de agua (tomado de: Mattevi y col., 1966).

De los residuos propuestos como esenciales en estudios de modificación química, tan sólo la Tyr²²⁴ (Ronchi y col., 1980; Rudie y col., 1980) y la Tyr²²⁸ (Marcotte y Walsh, 1978; Miyake y col., 1987) aparecen implicados en el centro activo, interaccionando con los grupos amino y carboxilo del sustrato, respectivamente. La Tyr²²⁴ había sido descartada en estudios de mutagénesis dirigida al comprobar que su sustitución por Phe, al parecer, no afectaba a la actividad significativamente. Sólo la Tyr²²⁸ ha sido descrita como esencial en los tres enfoques experimentales. También se ha visto confirmada la esencialidad de un residuo de arginina descrita en varios trabajos (Nishino y col., 1980; Ferti y col., 1981; Fitzpatrick y Massey, 1983; Vanoni y col., 1987; Gadda y col., 1994) y atribuida en algunos de ellos a la estabilización de la forma aniónica en N¹ en la flavina. Se trata de la Arg²⁸³, y parece interaccionar, al igual que Tyr²²⁸, con el carboxilo del sustrato.

La estructura del complejo DAAO·benzoato reveló que en el centro activo no contiene ninguna base en posición adecuada para actuar como postula la hipótesis del carbanión (Mattevi y col., 1996). Esta estructura apuntaba a la transferencia directa de hidruro desde el carbono α del sustrato hasta la posición N5 de la flavina.

Más recientemente, Todone y col. (1997) han analizado la estructura del complejo de la DAAO con el producto iminotriptófano (iTrp). Según estos autores, el complejo DAAO·iTrp confirma plenamente la hipótesis de transferencia directa de hidruro. El carbono α del iminoácido está a 3.8 Å del N5 de la flavina y, asumiendo que

un aminoácido se une al centro activo de igual forma que el iTrp, el hidrógeno α del sustrato está dirigido exactamente hacia el anillo flavínico como requiere tal transferencia. Es llamativa la similitud entre la forma de unión del iTrp a la DAAO y la de asociación del anillo de nicotinamida a diversas flavoenzimas dependientes de NAD(P)^+ , para las que se ha demostrado un mecanismo de transferencia directa de hidruro (Ghisla y Massey, 1989). La capacidad de DAAO de oxidar una amplia variedad de aminoácidos contrastaba con la estructura del complejo DAAO·benzoato, en la que se observó que el centro activo era una cavidad que se hacía inaccesible al disolvente por el lazo 216-228 que ha sido llamado tapa del centro activo. Tal observación condujo a la propuesta de un modelo que incluía un cambio de conformación cerrada a abierta por flexión de la tapa del centro activo. Este modelo se vio apoyado por estudios de proteólisis limitada (Tarelli y col., 1990). Las proteasas rompen el lazo 216-228 por la Arg²²¹ en la enzima libre, mientras que la unión de sustrato o inhibidor protege de dicha proteólisis. La capacidad de la cavidad del centro activo en la conformación cerrada observada en el complejo DAAO·benzoato es de 170 \AA^3 , que corresponde a un aminoácido con una cadena lateral de 4 carbonos (Mattevi y col., 1996). Esto explica la preferencia de la enzima por aminoácidos de cadena corta hidrofóbica pero deja sin explicación la capacidad de unir y oxidar sustratos mayores como D-Trp, D-Phe o D-Arg. El análisis de la estructura del complejo DAAO·iTrp permitió determinar que, incluso en presencia de una cadena lateral grande como la del triptófano, el lazo mantiene la configuración cerrada y el centro activo es inaccesible al disolvente. El espacio adicional requerido por tal cadena lateral es obtenido por un movimiento de la Tyr²²⁴, que está desplazada hacia afuera con respecto a su posición en el complejo DAAO·benzoato. De esta forma, la Tyr²²⁴ juega un papel crucial al adaptar su posición al tamaño de la cadena lateral a acomodar en el centro activo. Esta adaptabilidad se observa también en el complejo covalente formado por reacción fotoinducida de la DAAO con ácido 3-metil-2-oxobutírico (kVal). El pequeño tamaño del ligando en el complejo DAAO·kVal permite a la Tyr²²⁴ moverse hacia el interior del centro activo, adoptando una conformación similar a la observada en el complejo DAAO·benzoato. El estudio de la estructura del complejo DAAO·kVal ha permitido además comprobar la plasticidad del sitio de unión de flavina, ya que en este complejo la flavina se encuentra en una conformación muy distorsionada (no plana). Tal configuración de la flavina ha sido propuesta también para el intermediario 4α -hidroperóxido de flavina durante la semireacción oxidativa (Massey, 1994) en el que la configuración tetraédrica del $\text{C}4\alpha$ distorsiona la conformación de la flavina.

La plasticidad de los sitios de unión de sustrato y de flavina puede explicar el hecho de que DAAO sea una oxidasa altamente eficaz.

3.5. El H_2O_2 como producto y como modificador

La localización de la D-aminoácido oxidasa en peroxisomas se ha justificado por la producción de H_2O_2 en la reacción que cataliza. Desde el punto de vista industrial, el H_2O_2 debe tenerse muy en cuenta no sólo en la etapa de desaminación oxidativa de la cadena lateral de la cefalosporina C, en la que este compuesto ejerce inhibición por producto e inactivación de la enzima, sino también en la etapa de descarboxilación de la

cadena lateral de cetoadipilo para obtener el glutaril-7-ACA, conseguida por adición de este agente oxidante.

Los esfuerzos para establecer las condiciones óptimas para la D-aminoácido oxidasa en la producción de glutaril-7-ACA mostraron que el peróxido de hidrógeno es perjudicial para la cefalosporina C así como para la enzima. La adición de catalasa permitió retirar el peróxido de hidrógeno y reciclar el O_2 . Por esto, el peróxido de hidrógeno debe ser añadido después de la transformación enzimática; en estas condiciones se pueden obtener altos rendimientos de glutaril-7-ACA.

La D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* parece ser más resistente al daño por H_2O_2 que D-aminoácido oxidasas de otras fuentes. Esta característica unida a la fuerte unión del FAD y su alta eficacia catalítica son aspectos relevantes para su posible explotación en bioreactores industriales.

En este trabajo se describe el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* y también su efecto cinético como producto final de la reacción catalizada por esta enzima.

4. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

El estudio del centro activo de la D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* y de su modo de acción resulta interesante por dos razones fundamentalmente. En primer lugar, su aplicación en la elaboración de cefalosporinas semisintéticas puede verse favorecida con el aporte de datos que permitan la optimización de las condiciones de biotransformación y, en el mejor de los casos, la mejora de la enzima misma. En segundo lugar, como flavoproteína, ofrece una serie de facilidades en el estudio de su comportamiento. Además, la ausencia de datos sobre el papel fisiológico de esta enzima hace aún más atractivo su estudio.

Por estas razones, el presente trabajo experimental persigue los siguientes objetivos :

- **Optimización de la producción y purificación de la D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis***
- **Purificación de la enzima a partir de un clon de *Escherichia coli* que la hiperexpresa**
- **Caracterización molecular y estructural. Comparación con otras oxidasas.**
- **Estudio de la unión del cofactor**
- **Caracterización cinética en estado estacionario**
 - Efecto del pH
 - Efecto de la temperatura
 - Inhibición por productos e inhibidores reversibles
- **Modificación e identificación de residuos esenciales**
 - Modificación química
 - Mutagénesis dirigida
- **Estudio del efecto del H₂O₂**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

La cepa de *Rhodotorula gracilis* productora de D-aminoácido oxidasa fue adquirida de la colección americana de cultivos tipo (*Rhodospiridium toruloides*, cepa ATCC número 26217). D-fenilglicina, FAD, 2,4-dinitrofenilhidracina, pirofosfato, BIS-TRIS-propano, MES, EDTA férrico-sódico, tiamina, procedían de Sigma Chemicals (St. Louis, EEUU). Todos los otros sustratos e inhibidores reversibles fueron de ICN. El ácido trifluoroacético fue de Fluka (Buchs, Suiza). El ácido iodo-[2-¹⁴C]-acético procedía de Amersham Life Science (Buckinghamshire, Inglaterra). Los disolventes usados en HPLC fueron de Scharlau (Barcelona, España). Las resinas cromatográficas Sephadex G25, DEAE-Sephacel, Phenyl Sepharose CL-4B y Ultrogel AcA-44 fueron de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia), y el Cibacron Blue de Sigma Aldrich (St. Louis, EEUU). Los cartuchos de alta capacidad y flujo rápido Econo-Pack S y Q eran de BioRad (EEUU). Todo el resto de reactivos procedían de Merck (Darmstadt, Alemania).

2. FERMENTACIÓN DE LA LEVADURA

2.1. Mantenimiento de la cepa

La línea de levadura se mantuvo en cultivos crecidos en la oscuridad durante 48 horas a 30°C y mantenidos a 4°C en medio sólido usando un medio rico compuesto por extracto de levadura (3 g/l), extracto de malta (3 g/l), peptona (5 g/l), glucosa (10 g/l) y agar (2 %) con un pH final de 4.5. Los cultivos se renovaron cada dos meses comprobando las características fenotípicas macroscópicas y la ausencia de contaminación.

2.2. Condiciones de inducción y producción

La inducción de la expresión de D-aminoácido oxidasa se llevó a cabo lavando células provenientes de cultivos en medio rico tres veces con solución salina y sembrándolas en un medio de inducción que contenía como única fuente de nitrógeno D-alanina y como única fuente de carbono glucosa. La composición de este medio era la siguiente :

Glucosa	9.0 g
D-Alanina	2.7 g
CaCl ₂	0.3 g
NaCl	0.5 g
MgSO ₄	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MES	4.9 g
EDTA·FeNa	6.1 mg
ZnSO ₄ ·7(H ₂ O)	2.0 mg
Tiamina·HCl	5.1 mg
Pantotenato·Na	2.4 mg
Agua destilada hasta	1000 ml
KOH hasta	pH 5.6

Las condiciones de esterilización en autoclave fueron 110°C y 30 minutos para minimizar la caramelización de la glucosa.

Tras 48 horas a 30°C en placas Petri con el citado medio agarizado, las células se cosechaban añadiendo 10 ml de solución salina (0.9 % p/v) y raspando suavemente la superficie del cultivo. A la suspensión celular así obtenida se añadía glicerol hasta un 15% (v/v) y se determinaba la concentración celular mediante lectura de la densidad óptica a 660 nm. La medida de dispersión de luz visible se había relacionado previamente con la cantidad de células determinada por recuento en cámara de Neubauer, resultando que una suspensión celular con una $D.O._{660}=1$ contenía $2.2 \cdot 10^6$ células por mililitro. Esta suspensión era utilizada directamente para la siembra en medio líquido, o bien congelada a -80°C para su uso posterior.

El medio de inducción y producción fue generalmente sembrado en erlenmeyer, usando una relación volumen de medio/capacidad nominal de 1/4 con un inóculo suficiente para alcanzar una concentración celular de 48000 células por mililitro y se mantuvo en agitación orbital (200 rpm) a 30°C durante 36 horas protegido de la luz. Tras la incubación, las células se colectaban por centrifugación a 7000 g durante 30 minutos a 4°C, decantando posteriormente el sobrenadante y recogiendo la pasta celular para la extracción de enzima.

2.3. Curva de crecimiento y producción

La caracterización de la fermentación de la levadura se llevó a cabo usando un fermentador Braun-Biotech (Alemania) con una capacidad máxima de trabajo de 5 l. En estos experimentos, los cambios de pH no fueron compensados, y la pO_2 se mantuvo entre el 50 y el 100% de saturación. El mantenimiento de la pO_2 se consiguió con un flujo de aire constante de 10 l/min. y variando la agitación entre 150 y 750 rpm. El inóculo de 250 ml con una $D.O._{660}$ de 2 se añadió en condiciones de esterilidad a 4,75 l de medio estéril en el fermentador y durante la fermentación se recogieron muestras de 10 ml a intervalos regulares de tiempo y en condiciones estériles hasta completar un tiempo de 75 h desde el final de la inoculación.

Cada muestra por separado se sometió a un protocolo de ruptura que previamente se había identificado como el más eficaz (Figura 11). El tampón de extracción estaba compuesto por fosfato potásico 100 mM, glicerol al 10%, β -mercaptoetanol 5 mM, EDTA 2 mM y PMSF 1 mM. Este último componente se mantenía en una solución 100 mM en DMSO, añadiéndose al tampón de extracción al 1% (v/v) inmediatamente antes de su uso y repitiendo la adición cuando la duración del proceso de extracción lo hacía aconsejable.

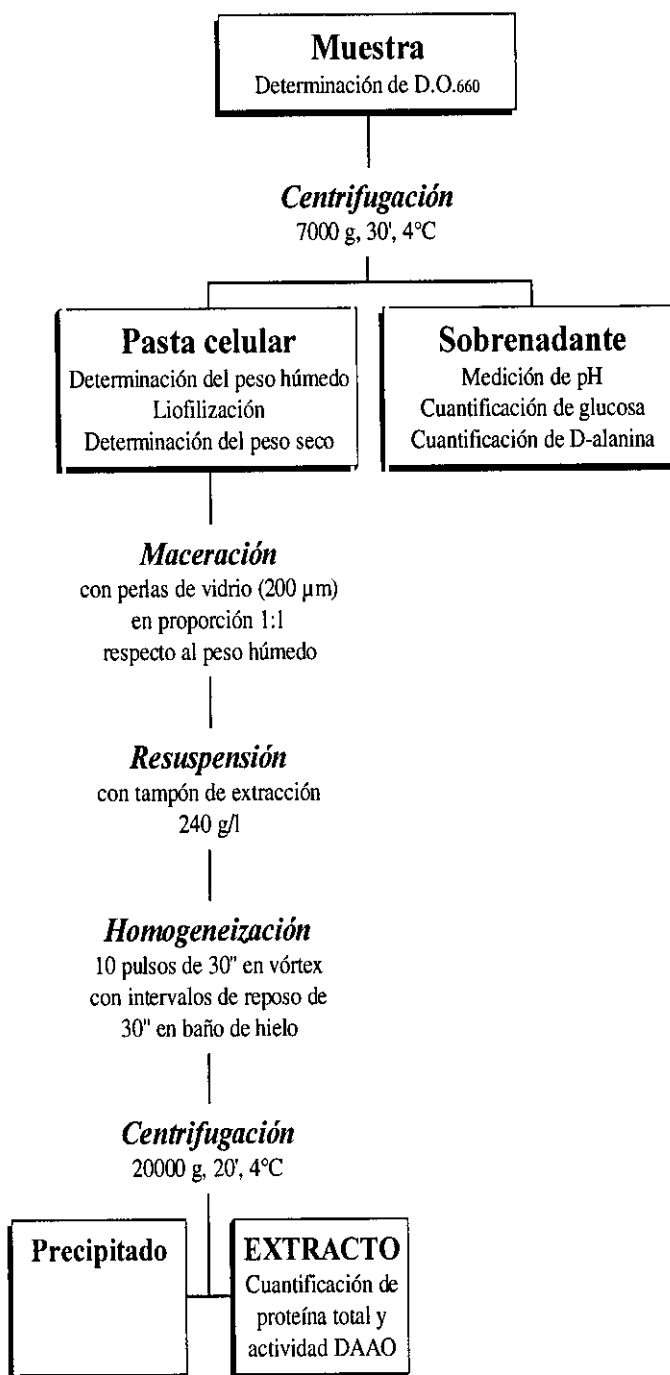


Figura 11. Procesamiento de las muestras tomadas del fermentador durante el crecimiento.

Con los datos de los dobles experimentales obtenidos de cada muestra se elaboraron las diferentes curvas, tasas específicas y rendimientos de la fermentación.

3. PURIFICACIÓN DE LA D-AMINOÁCIDO OXIDASA

3.1. Purificación a partir de cultivos de *Rhodotorula gracilis*

La pobre estabilidad de la D-aminoácido oxidasa hace imprescindible la inclusión en el método de aislamiento de medidas tendentes a mejorar el porcentaje de recuperación tras cada paso de purificación.. Por este motivo, todo manejo de preparaciones de DAAO se llevó a cabo a 4°C y protegiendo las muestras de la luz en la medida de lo posible. La estabilidad de la enzima pudo mejorarse por la adición de glicerol a los tampones, así como de EDTA y PMSF al tampón de extracción. El uso de detergentes como el bromuro de cetilpiridinio, propuesto en la bibliografía (Simonetta y col., 1987), no mejoró el rendimiento de la extracción en nuestro caso. El β -mercaptoetanol, usado frecuentemente como estabilizador de preparaciones de DAAO, resultó en nuestra experiencia útil únicamente durante la extracción, mientras que en las últimas etapas de aislamiento su adición aceleraba la inactivación de DAAO. Por el contrario, encontramos un potente efecto estabilizador del FAD que nos hizo incluirlo en los tampones rutinariamente.

3.1.1. Ruptura/permeabilización de la pared celular

La pared celular de *Rhodotorula gracilis* está compuesta por múltiples capas y su permeabilización o ruptura resultan considerablemente más difíciles que en el caso de otras levaduras usadas en estudios de pared como *Saccharomyces cerevisiae* (Kollár y col., 1995; Van der Vaart y col., 1995) o *Candida albicans* (Marcilla y col., 1993; Ruiz-Herrera y col., 1994). Durante varias fases del ciclo celular de *Rhodotorula gracilis* se ha observado un engrosamiento anormal de la pared (Kocková-Kratochvílová y Holan, 1976).

Numerosos métodos (Arnold, 1997; Catley, 1988) se han descrito para destruir parcial o totalmente la pared celular de levaduras. Dichos métodos pueden clasificarse en cuatro grupos fundamentales: mecánicos, químicos, enzimáticos y térmicos. En todos los casos debe tenerse en cuenta que el método elegido puede ser simplemente responsable de un primer evento de desestructuración que desencadena a su vez el mecanismo de autólisis durante el cuál, enzimas propias del microorganismo se encargan de atacar otros enlaces hasta alcanzar la destrucción total de la pared y la liberación al medio del contenido intracelular por el carácter hiperosmótico del mismo.

En el presente estudio se han probado algunos de los métodos descritos, así como combinaciones de ellos. En todos los casos la suspensión resultante de la homogeneización se agitó suavemente durante 2 horas a 4°C antes de centrifugar a 4000 x g durante 15 minutos a 4°C para decantar el sobrenadante con las proteínas liberadas al medio. A continuación se detallan los procedimientos evaluados.

3.1.1.1. Métodos mecánicos

Prensa hidráulica (French Press)

La pasta celular resuspendida en tampón de extracción a 240 g/l se sometió a ruptura en una prensa hidráulica SLT-AMINCO usando una cámara de ruptura de 1 pulgada de diámetro con una capacidad máxima de 50 ml, ajustando la presión máxima en el indicador a 1100 psi en modo HIGH, lo que equivale a una presión efectiva en el interior de la cámara de 17000 psi. Tanto la cámara de ruptura como la suspensión se enfriaban en baño de hielo antes de iniciar la maniobra. La esfera de teflon usada en el extremo del estrangulador se sustituía una vez cada 250 ml de suspensión. La eficiencia del método se controlaba por observación microscópica y cuantificación de proteína en el sobrenadante. La suspensión resultante se centrifugaba a 20000 g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante resultante era analizado y/o usado para el aislamiento de DAAO.

Homogeneización por agitación vigorosa con perlas de vidrio

Sobre alícuotas de 0.5 ml de una suspensión idéntica a la usada en el método anterior se añadían perlas de vidrio de 500 µm de diámetro a razón de 1 gramo por cada gramo de pasta celular y a continuación se sometían a 10 pulsos de 30 segundos de agitación vigorosa en un agitador de tubos (vortex) con intervalos de reposo en baño de hielo de igual duración.

Sonicación

Las células resuspendidas e introducidas en un baño de hielo se sometían a 4 pulsos de 15 segundos con intervalos de reposo de 45 segundos en un sonicador de sonda Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Co., Connecticut).

3.1.1.2. Métodos térmicos

Congelación/descongelación repetida

La pasta celular era congelada durante 14 horas a -20°C y descongelada durante 10 horas a temperatura ambiente hasta completar un total de 3 ciclos. Tras la última descongelación, las células se resuspendían en tampón de extracción hasta una concentración de 240 g/l.

3.1.1.3. Métodos químicos

Inducción de autólisis por tolueno

A la suspensión celular con 240 g/l en tampón de extracción se añadía tolueno al 2% (v/v) y se agitaba suavemente a temperatura ambiente tomando muestras para

determinación de la liberación al medio de proteínas y de actividad DAAO. Se ha descrito (Arnold, 1972) la aceleración de la autólisis inducida por tratamiento con tolueno al añadir compuestos tiólicos (cisteína, DTT, etc.). En nuestro caso, el β -mercaptoetanol presente en el tampón de extracción se ha considerado suficiente para conseguir tal efecto.

3.1.1.4. Métodos enzimáticos

Liticasa

La liticasa es una enzima que hidroliza enlaces β -1,3-glicosídicos como los presentes en el glucano de la pared celular de levaduras. A una suspensión celular 240 g/l en tampón fosfato potásico 10 mM con β -mercaptoetanol 5 mM y EDTA 2 mM se añadió una solución de liticasa de *Arthrobacter luteus* disuelta en el mismo tampón hasta una concentración final de 100 U/ml. La mezcla se incubó 1 hora a 25°C y a continuación se determinó la concentración de proteínas y la actividad DAAO del sobrenadante tras 10 minutos de centrifugación a 10000 g.

La definición de unidad de actividad liticasa se basa en experiencias con levaduras típicamente usadas en estudios de composición de pared o de inducción de la formación de esferoplastos y es la cantidad necesaria para producir un incremento de absorbancia a 800 nm de 0.001 por minuto a pH 7.5 y 25°C, usando una suspensión de levaduras como sustrato en un volumen final de reacción de 3 ml.

Enzimas líticas

También se probó una preparación de enzimas líticas comercialmente disponible, concretamente las de *Rhizoctonia solani*, que contienen actividades glucanasa, celulasa y citolítica. El protocolo seguido fue el mismo que en el caso de liticasa usando una concentración final de 1 mg/ml.

3.1.1.5. Métodos combinados

Liofilización/maceración con perlas de vidrio

La pasta celular era liofilizada en presencia de perlas de vidrio de 300 μ m de diámetro (0.4 g/g de células) y posteriormente macerada en un mortero hasta conseguir un fino polvo que se resuspendía en tampón de extracción hasta una concentración de 240 g/l.

Liofilización/maceración/agitación con perlas de vidrio

La pasta celular era liofilizada, previa adición de perlas de vidrio de 300 μm de diámetro al 50% (p/p) respecto al peso húmedo. A continuación se maceraba en mortero hasta conseguir un fino polvo y se añadía tampón de extracción hasta 240 g/l. La suspensión resultante se repartía en alícuotas de 5 ml y se agitaba en tubos de vidrio usando un agitador de tubos (vortex) en 10 intervalos de 30 segundos separados por períodos de reposo en baño de hielo de igual duración.

3.1.2. Estabilidad a 4°C en presencia de diferentes efectores

La baja estabilidad de las preparaciones de DAAO, en particular de aquellas correspondientes a las primeras etapas de purificación, obliga a llevar a cabo todo el proceso a 4°C y sin intervalos de reposo que propicien la pérdida de actividad por degradación o desnaturalización. Incluso tomando estas medidas, debido a la larga duración de algunas de las etapas, la recuperación tras esos pasos es significativamente baja. Por esto, se llevaron a cabo experimentos en los que se probó la eficacia de diversos compuestos en la estabilización de DAAO en preparaciones impuras.

Muestras de 100 μl de una preparación de DAAO en tampón fosfato potásico 10 mM a pH 7.5 proveniente de una de las primeras etapas de purificación se mantuvieron durante 180 horas a 4°C tras la adición de 100 μl de diferentes efectores. Como referencia, se prepararon mezclas en las que, en lugar de efector, se añadió agua. En cada caso se prepararon blancos a los que, en vez de solución enzimática, se añadió tampón.

Los diferentes efectores y los intervalos de concentración probados fueron :

PMSF	0.78 - 50.00 mM
Benzamidina	6.25 - 50.00 mM
β -mercaptoetanol	0.16 - 10.00 mM
Ditiotreitol	0.16 - 10.00 mM
EDTA	0.16 - 10.00 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.5)	1.56 - 100.0 mM
NaCl	7.81 - 500.0 mM
Ácido ascórbico	0.16 - 10.00 mM
FAD	0.078 - 1.25 mM
Cefalosporina C	0.16 - 10.00 mM
D-alanina	0.39 - 25.00 mM
Etanol	0.39 - 25.00 % (v/v)
Metanol	0.39 - 25.00 % (v/v)
Isopropanol	0.39 - 25.00 % (v/v)
Glicerol	0.39 - 25.00 % (v/v)
Dimetilsulfóxido	0.39 - 25.00 % (v/v)
Polietilenglicol 3350	0.08 - 5.00 % (v/v)
Polietilenglicol 6000	0.08 - 5.00 % (v/v)

De cada mezcla se ensayaron alícuotas de 25 μ l al inicio de la incubación y a las 12, 38, 86 y 180 horas con D-alanina 10 mM y tampón fosfato potásico 50 mM en las condiciones típicas de ensayo.

3.1.3. Precipitación con sulfato amónico

El extracto crudo (cerca de 170 ml) proveniente de 2.5 l de cultivo (aproximadamente 40 g de pasta celular) fue sometido a un fraccionamiento por precipitación de proteínas mediante la adición de sucesivas cantidades de sulfato amónico. La sal fue previamente molida hasta conseguir un fino polvo con el fin de minimizar la precipitación prematura de proteínas en el entorno de los cristales de sal añadida. El extracto fue agitado en baño de hielo durante la lenta adición de las cantidades de sal necesarias para alcanzar cada uno de los porcentajes de saturación deseados. La velocidad de agitación era suficiente para garantizar una rápida disolución de la sal, pero no tan alta como para provocar la desnaturalización y consecuente formación de espuma. La separación de la proteína precipitada en cada paso se consiguió por centrifugación a 20000 g y 4°C durante 15 minutos. Toda la actividad DAAO precipitaba entre el 30 y el 60% de saturación. El precipitado correspondiente al 60% de saturación fue redissuelto mediante agitación muy suave a 4°C tras la adición de 10 ml de tampón fosfato potásico 10 mM, pH 8.0 con glicerol al 10% y FAD 10 μ M (tampón A).

3.1.4. Desalado en Sephadex G-25

La preparación enzimática obtenida en el anterior paso se aplicaba a una columna de desalado Sephadex G-25 de 5.6 cm de diámetro y 18.5 de altura equilibrada con tampón A. La presencia de sulfato amónico en el eluido se comprobaba por reacción con cloruro de bario, el cuál forma un precipitado blanco muy llamativo incluso con cantidades mínimas de sulfato amónico. Después de haber eluido toda la sal, se recogía el eluido correspondiente a la banda de proteínas identificada por una coloración rosa.

3.1.5. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel

El extracto celular se cargó en una columna de 2.7 cm de diámetro y 22 de altura ($V_{lecho} \approx 126$ ml) de DEAE-Sephacel equilibrada con tampón A. La actividad DAAO eluyó isocráticamente cuando se hicieron pasar 2 volúmenes del mismo tampón.

3.1.6. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas en Phenyl-Sepharose CL-4B

Las fracciones activas del anterior paso se reunían y se les añadía una solución 5M NaCl hasta una concentración final de 1 M mientras se agitaba la preparación

suavemente a 4°C. Esta solución se aplicaba directamente a una columna (1.4 x 12.5 cm) de Phenyl-Sepharose CL-4B equilibrada con fosfato potásico 10 mM a pH 7.5 con NaCl 1M y EDTA 2 mM (tampón H₀). Cuando había pasado toda la muestra, se cerraba la columna durante 40 minutos y a continuación se lavaba con 100 ml de tampón H₀ y se volvía a cerrar dejándola así toda la noche. Al día siguiente se eluía la actividad con 100 ml de un tampón fosfato potásico 10 mM a pH 7.5 con glicerol al 20% y EDTA 2 mM (tampón H₁).

3.1.7. Cromatografía de intercambio catiónico en cartucho Mono-S (fast-flow)

La actividad recuperada de la cromatografía anterior se concentraba hasta un volumen inferior a 5 ml y se dializaba contra tampón MES 10 mM a pH 6.5 con glicerol al 10%, EDTA 2 mM y FAD 10 µM (tampón S). La preparación resultante se aplicaba a un cartucho de flujo rápido y alta capacidad Mono-S (BioRad) de intercambio catiónico con un volumen de lecho de 5 ml equilibrado con tampón S e integrado en un sistema de FPLC con un flujo de 2 ml/min. Tras 20 minutos de elución isocrática con tampón S, se aplicaba un gradiente de NaCl hasta 0.5 M en el mismo tampón durante 20 minutos, seguido de una elución isocrática a 0.5 M NaCl durante 10 minutos, recogiendo durante toda la elución fracciones de 1 ml en las que posteriormente se valoraba concentración de DAAO determinando la absorbancia a 274 nm con un paso óptico de 1 cm usando la siguiente relación :

$$[DAO](mg / ml) = A_{274} / 2.78 \quad (1)$$

así como la actividad DAAO por ensayo con D-fenilglicina.

3.1.8. Cromatografía de intercambio aniónico en cartucho Mono-Q (fast-flow)

Las impurezas aún presentes en la solución de DAAO obtenida en la anterior cromatografía se separaron en un cartucho similar al anterior pero con relleno de Mono-Q, un intercambiador aniónico. La solución enzimática se dializó frente a tampón A ajustado a pH 8.3 y se concentró para aplicarla al cartucho y conducir la elución de forma similar a la usada para el cartucho de Mono-S.

La proteína obtenida tras este paso era electroforéticamente pura y la relación A_{274}/A_{455} era inferior a 10.

3.2. Purificación a partir de un clon de *E.coli* que hiperexpresa DAAO

También se purificó la DAAO a partir de un clon de *Escherichia coli* portador de un plásmido con la secuencia codificadora del gen de DAAO de *Rhodotorula gracilis*. Dicho clon fue obtenido en el laboratorio del Dr. José Luis García López del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C..

3.2.1. Ruptura celular

La pasta celular procedente del cultivo en fermentador fue resuspendida en tampón de extracción a una concentración de 240 g/l. La suspensión resultante fue sometida a ruptura en presencia de PMSF 1mM por ultrasonidos en 5 pulsos de 15 segundos usando un aparato de sonda Sonifier B-12 de Branson Sonic Power Co. (Connecticut, EEUU). Tras centrifugación a 10000 rpm durante 20 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Centrikon T-124 de Kontron Instruments (Zurich, Suiza) usando un rotor A 8.24, se decantó el sobrenadante y sobre él se añadió glicerol hasta un 10 % (v/v).

3.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sephacel

El extracto celular se cargó en una columna de 2.5 cm de diámetro y 18 de altura ($V_{lecho} \approx 88$ ml) de DEAE-Sephacel equilibrada con tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7.5 con glicerol al 10 % (v/v), EDTA 2 mM y β -mercaptoetanol 5 mM (tampón C) y la actividad DAAO eluyó isocráticamente con 2 volúmenes del mismo tampón.

3.2.4. Cromatografía de afinidad en Cibacron-Blue

El grupo funcional de esta resina es similar al FAD por lo que la apoproteína se adsorbe, quedando excluidas la mayor parte de proteínas acompañantes. La apoproteína se obtuvo según se describe más adelante (pág.39) y se cargó (en tampón C) en una columna de 1.5 cm de diámetro y 11 de altura ($V_{lecho} \approx 19.5$ ml) de Cibacron-Blue equilibrada con el mismo tampón. Después de lavar la columna con 2 volúmenes de tampón C, se aplicó un gradiente de KBr hasta 1 M en el mismo tampón y se recogieron fracciones de 1.5 ml. Las fracciones activas se unían y se concentraban para el siguiente paso. El ensayo de actividad se realizaba tras reconstitución de la holoenzima por adición de FAD en proporción 10:1 respecto a la apoproteína.

3.2.5. Cromatografía de penetrabilidad en Ultrogel AcA-44

La muestra se aplicó a una columna de 1.5 cm de diámetro y 50 cm de altura ($V_{lecho} \approx 88$ ml) de Ultrogel AcA-44 equilibrada con un tampón igual al C excepto en la concentración de fosfato, que aquí era 50 mM. La separación de las proteínas se llevó a cabo haciendo pasar 150 ml del mismo tampón y recogiendo fracciones de 1 ml. Las fracciones activas tras este paso contenían DAAO electroforéticamente pura.

4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.1. Cuantificación de proteína

La concentración de proteína fue determinada por diferentes métodos en función del grado de pureza y de la precisión requerida en cada caso.

A lo largo de la purificación, la cantidad de proteína total de las preparaciones se determinaba bien por la absorbancia a 280 nm asumiendo una equivalencia directa con la concentración expresada en mg/ml, o bien por el método de Bradford. Este último se lleva a cabo añadiendo 40 μ l de reactivo de Bradford concentrado sobre 160 μ l de la muestra a ensayar y leyendo la absorbancia a 595 nm tras 10 minutos a temperatura ambiente. Las lecturas obtenidas se transformaban en concentraciones de proteína aplicando un factor de conversión calculado en base a una recta patrón construida con diferentes concentraciones de albúmina bovina.

Una vez purificada, la concentración de DAAO solía determinarse espectrofotométricamente por absorción de luz ultravioleta ($\epsilon_{274}=1.04 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) o de luz visible ($\epsilon_{455}=13.50 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

En aquellos casos en que se requería un dato de gran precisión, la concentración de centros activos fue determinada por retirada del FAD por el método del bromuro potásico ya mencionado y posterior titulación de centros activos por adición de sucesivas cantidades de FAD. Esta titulación puede hacerse por seguimiento de actividad, por fluorimetría o por corrimiento hipercrómico a 493 nm.

Al titular apoproteína por seguimiento de la actividad, se observa un primer tramo de relación lineal entre la cantidad de FAD añadido y la actividad enzimática y una posterior estabilización de la señal en un valor máximo. La abcisa correspondiente al punto de intersección de las tangentes inicial y final de la curva equivale a la concentración de sitios de unión de FAD, o más exactamente, de monómeros activos.

Si lo que se sigue es la evolución de la fluorescencia flavínica a lo largo del mismo experimento, observamos dos tramos lineales separados por una región de inflexión. El primer tramo, de pendiente menor corresponde a la fluorescencia del FAD unido a la apoproteína, es decir, parcialmente apantallado, mientras que el segundo, de mayor pendiente, es reflejo del FAD libre tras la saturación de sitios de unión. También en este caso la intersección de las prolongaciones de estos dos tramos tiene una abcisa que equivale a la concentración de monómeros en la solución valorada.

Finalmente, también puede determinarse la concentración de DAAO siguiendo el corrimiento hipercrómico que ocurre en torno a 493 nm durante la unión de la flavina.

4.2. Métodos de ensayo de la actividad DAAO

Numerosos métodos se han descrito para la detección de actividad DAAO en tejidos, preparaciones celulares y soluciones. Algunos de ellos se basan en el seguimiento de la desaparición del sustrato reductor o del consumo de oxígeno. En el presente trabajo experimental sólo se han usado métodos que detectan la aparición de alguno de los productos de la reacción con diferentes sustratos.

4.2.1. Valoración del H_2O_2

La cuantificación del H_2O_2 (P_2) producida es especialmente útil en los experimentos de inhibición por producto en las que se añaden diferentes cantidades del cetoácido (P_1) a la mezcla de reacción. Dicha cuantificación se realizó por acoplamiento de la reacción de la DAAO con D-Ala o D-Ser y la de la peroxidasa con *o*-fenilendiamina. Las mezclas de reacción (200 μl) contenían D-Ala 1 mM (o D-Ser 5 mM), diferentes concentraciones del inhibidor piruvato (o hidroxipiruvato), peroxidasa de rábano 100 $\mu\text{g/ml}$, *o*-fenilendiamina 50 $\mu\text{g/ml}$ y DAAO 5.3 nM en tampón fosfato 50 mM a pH 8.0. Las velocidades iniciales se determinaron por análisis de las curvas temporales de evolución de la absorbancia a 411 nm durante 10 minutos a 33°C. Los datos de absorbancia se tradujeron a concentraciones de H_2O_2 usando la pendiente de una recta patrón construida previamente usando concentraciones conocidas de H_2O_2 . Estas soluciones de referencia se prepararon a su vez a partir de una preparación comercial al 30% (p/p) que se tituló espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción molar de $43.6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 240 nm.

En las condiciones elegidas, la reacción del H_2O_2 producida durante la reacción con la *o*-fenilendiamina catalizada por peroxidasa es suficientemente rápida como para que las velocidades observadas sean las correspondientes a la reacción de DAAO, como demuestran los valores obtenidos para los parámetros cinéticos en ausencia de inhibidor.

4.2.2. Valoración del α -cetoácido

4.2.2.1. Titulación de grupos ceto

La 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) es un reactivo general de valoración de grupos ceto que reacciona formando dinitrofenilhidrazonas características con máximos de absorción generalmente en torno a 450 nm.

El iminoácido (P_1) generado como primer producto de la oxidación del aminoácido sufre una rápida y espontánea transformación a α -cetoácido (P_1') con liberación de amoníaco. El α -cetoácido es, a su vez, susceptible de descarboxilación oxidativa por acción del H_2O_2 . No obstante, no todos los sustratos rinden cetoácidos con igual susceptibilidad a dicha descarboxilación. En los estudios de inhibición por H_2O_2 es especialmente importante asegurarse de que el cetoácido no sufre descarboxilación

por efecto de las cantidades relativamente elevadas de H_2O_2 añadidas a las mezclas de reacción.

Los cetoácidos generados por oxidación de D-alanina y D-serina (piruvato e hidroxipiruvato, respectivamente) fueron incubados con diferentes concentraciones de H_2O_2 con el fin de determinar su resistencia a la descarboxilación oxidativa. Soluciones de piruvato e hidroxipiruvato 250 μM fueron incubadas con H_2O_2 5 y 50 mM durante 45 minutos a temperatura ambiente y a diferentes tiempos se retiraron alícuotas de las que se determinó el contenido de grupos ceto. En ningún caso se observó disminución de la concentración de grupos ceto con el tiempo de incubación. Estos dos sustratos fueron pues escogidos para los experimentos de inhibición por H_2O_2 .

El método de la DNPH consiste en la adición sobre 100 μl de reacción a tiempo final de 10 μl de una solución saturada (≈ 10 mM) de 2,4-dinitrofenilhidracina en 1N HCl, incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente y revelado con 90 μl de 2N NaOH durante 5 minutos. La absorbancia a 450 nm de tal mezcla se convertía a concentración de producto usando los coeficientes de extinción molar previamente calculados para las dinitrofenilhidrazonas del piruvato ($\epsilon=4525 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e hidroxipiruvato ($\epsilon=3410 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

4.2.2.2. Valoración espectrofotométrica

Usando D-fenilglicina (Fonda y Anderson, 1967; Ferti y col., 1981; Swenson y col., 1984) o D-fenilalanina se puede seguir la generación de producto por su absorción de luz en torno a 250 nm. Estos sustratos, no obstante, no son adecuados para la cuantificación de grupos ceto en experimentos de inhibición por H_2O_2 ya que sufren con facilidad descarboxilación en presencia de este agente oxidante.

El ensayo espectroscópico usando D-fenilglicina ($K_M=2.5$ mM) fue usado típicamente en la determinación de actividad de fracciones procedentes de etapas en el proceso de purificación de la enzima.

Las reacciones (1 ml) contenían D-fenilglicina 25 mM, fosfato potásico 50 mM a pH 8.0 y entre 10 y 50 μl de la muestra a ensayar. Tras 10 minutos de incubación a 30°C , se paraban con 100 μl de ácido acético y se centrifugaban a $10000 \times g$ durante 10 minutos. La absorbancia del sobrenadante a 252 nm se usaba para calcular la concentración de ácido benzoilfórmico ($\epsilon=12253 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) producida en la reacción.

4.2.3. Ensayo con cefalosporina C mediante HPLC

La extensión de la reacción de DAAO con su sustrato industrial, la cefalosporina C (Cef C; $K_M=2.75$ mM), puede determinarse por análisis de cromatogramas tras separación por HPLC de las mezclas de reacción. La inhibición de DAAO por H_2O_2 fue caracterizada también usando este método de ensayo.

Las reacciones (200 μ l) contenían Cef C entre 0.3 y 20.0 mM, H_2O_2 entre 1.2 y 12.0 mM y DAAO 8.33 nM en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 8.0. Tras 5 minutos a 30 °C se detenían añadiendo 25 μ l de ácido acético. A continuación se añadían 27.5 μ l de H_2O_2 100 mM para garantizar la completa descarboxilación del cetoadipil-7-ACA a glutaril-7-ACA y así simplificar el análisis posterior. A la columna de fase reversa C-18 (25 cm) se aplicaban entonces 100 μ l de la mezcla y se practicaba una elución isocrática con tampón fosfato potásico a pH 7.0 y metanol al 6% (v/v) con un flujo de 1 ml/min. Los tiempos típicos de elución de la Cef C y el glutaril-7-ACA en dichas condiciones eran 7.5 y 8.6 minutos, respectivamente. Usando la integración del área bajo los picos que proporciona el programa System Gold se calcularon los porcentajes de conversión en cada caso y se usaron en el posterior análisis cinético.

5. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

Se realizó usando geles de acrilamida al 12.5 % (p/v), siguiendo el método descrito por Laemmli (1970) y modificado por Chappmann y col. (1976). La separación de proteínas se llevó a cabo usando un sistema vertical de placas (10 x 7 cm) Miniprotean II (BioRad, EEUU). La tinción de bandas proteicas se llevó a cabo con azul de Coomassie.

5.2. Electroforesis en condiciones nativas y tinción de actividad

La electroforesis se realizó sobre geles de acrilamida al 5 % (p/v) a pH 8.8. en ausencia de SDS. El sistema de tampones fue de pH 8.3 tanto en la cubeta interior como en la exterior. Las muestras se cargaron en un tampón de aplicación sin SDS ni β -mercaptoetanol y la electroforesis se condujo a voltaje variable ajustando la intensidad a 35 mA por gel. Las muestras se aplicaron por duplicado, una vez en cada mitad del gel para posibilitar la comparación entre las tinciones de proteínas en una mitad y de actividad en la otra.

La tinción de bandas con actividad D-aminoácido oxidasa se llevó a cabo con cloruro de iodonitrotetrazolio, un compuesto capaz de actuar como aceptor electrónico alternativo al O_2 . Una mitad del gel se sumergió en una solución con FAD 23 μ M, cloruro de iodonitrotetrazolio 93 μ g/ml y D-alanina 32.5 mM en tampón pirofosfato sódico 35 mM, pH 8.5, durante 2 horas a 37°C. Las bandas de DAAO se revelaban así con una coloración rosa y a continuación se recomponía el gel adjuntando la otra mitad que se había sometido a tinción de proteínas con azul de Coomassie.

5.3. Isoelectroenfoque analítico

Se llevó a cabo en gel de poliacrilamida preparado con una batería de anfolitos (Ampholine PAG, Pharmacia, Suecia) que permiten un intervalo operativo de pH de 3.5 a 9.5. El gel contenía acrilamida (15%), ND-40 (1.7%), urea (48%), persulfato amónico (PSA ; 0.02%) y las soluciones de anfolitos en la proporción indicada por el proveedor. La muestra se aplicaba en un tampón con los mismos componentes que el gel (excepto acrilamida y PSA) pero con ND-40 al 1% y β -mercaptoetanol al 10%. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema Miniprotean (BioRad). Del gel resultante se separaron varias calles que fueron segmentadas para la medición del pH a cada altura y el resto del gel, con la banda proteica, se tiñó con azul de Coomassie.

6. OBTENCIÓN DE LA APOPROTEÍNA

En aquellos casos en que interesaba obtener la forma de apoproteína (cromatografía en Cibacron Blue, efecto del H_2O_2 , unión del FAD, etc.), se retiró el FAD de la holoenzima siguiendo el protocolo descrito por Casalin y col. (1991) que se basa en otro propuesto para la enzima de riñón de cerdo (Massey y Curti, 1966). Este método aprovecha la capacidad del anión bromuro de debilitar la interacción del FAD con la proteína. La solución de holoenzima se sometía a diálisis prolongada frente a 2 M KBr con glicerol al 20 % (v/v), fosfato potásico 250 mM, EDTA 2 mM y β -mercaptoetanol 5 mM a pH 7.5. Esta diálisis se mantenía durante 48 horas cambiando el tampón de diálisis cada 12. A continuación se continuaba la diálisis frente al mismo tampón sin KBr durante otras 12 horas. La ausencia de actividad enzimática y de los picos característicos de la región visible del espectro de flavoproteínas eran comprobadas en las preparaciones de apoproteína así obtenidas.

7. RECONSTITUCIÓN DE LA HOLOENZIMA

Antes de determinar la actividad enzimática de preparaciones de DAAO a las que se había retirado el cofactor, la reconstitución de la holoenzima se lograba por incubación durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente de la apoproteína con FAD en exceso (proporción 10:1). En los estudios de la asociación del FAD y la apoproteína, se dejaban transcurrir 5 minutos entre cada adición de FAD y la lectura o determinación de actividad. Se pudo comprobar que, en estas condiciones, se alcanzaba el equilibrio entre ambas especies.

8. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

8.1. Determinación de la masa molecular

Se llevó a cabo por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y por cromatografía de penetrabilidad en Ultrogel AcA-44. En el primer caso las proteínas empleadas como patrones de masa molecular fueron las suministradas por BioRad (Low Range Molecular Weight Markers): fosforilasa b de músculo de conejo (97.4 kDa), seroalbúmina bovina (66.2 kDa), ovoalbúmina (45.0 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31.0 kDa), inhibidor de tripsina de soja (21.5 kDa) y lisozima de clara de huevo (14.4 kDa). De la representación semilogarítmica de los pesos moleculares frente a la movilidad electroforética relativa se extrajeron los parámetros que permitieron calcular la masa molecular de la DAAO a partir de su movilidad relativa. En el segundo se utilizaron los mismos patrones de masa molecular a excepción de la anhidrasa carbónica y la lisozima y con la novedad del citocromo *c* de corazón de caballo (12.3 kDa). El cálculo de los volúmenes de exclusión y total de la columna se realizó usando azul de dextrano y *p*-nitrofenol, respectivamente. Los logaritmos de los pesos moleculares se representaron frente al coeficiente de partición, definido como $(V_{\text{elución}} - V_0) / (V_t - V_0)$, y la ecuación de la recta resultante se empleó en el cálculo de la masa molecular de la DAAO partiendo de su volumen de elución.

8.2. Análisis de aminoácidos

La composición de aminoácidos fue determinada mediante hidrólisis ácida de la proteína y posterior análisis automático en un analizador Durrum D-500. A las muestras desecadas se añadieron 200 μ l de ácido clorhídrico 5.7 N tridestilado azeótropo con fenol al 0.1%. Tras cerrar los tubos al vacío, se condujeron las hidrólisis a 110°C durante 24 horas. Finalmente, se secan las muestras al vacío en un desecador que contenía perlas de NaOH y se lavan las muestras hidrolizadas 2 veces con 200 μ l de agua.

8.3. Espectroscopía de absorción

Los espectros de absorción de las formas holo- y apo- de la DAAO se registraron en un espectrofotómetro DU-70 (Beckman, Alemania) entre 230 y 520 nm con una velocidad de barrido de 600 nm/min. Una solución de apoproteína 90 μ g/ml en tampón C se introdujo en una cubeta de cuarzo con 1 cm de paso óptico y se grabó el espectro correspondiente contra un blanco del mismo tampón. La misma solución de apoproteína se incubó con FAD 50 μ M durante 15 minutos a temperatura ambiente y su espectro se registró frente a una blanco de tampón con la misma concentración de FAD.

8.4. Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de emisión de las formas apo- y holo- de la DAAO se registraron en un espectrofluorímetro MPF-44E de Perkin-Elmer (Connecticut, EEUU). Se utilizó

una cubeta de cuarzo de 600 μ l de capacidad, con un paso óptico de 1cm. Los barridos se realizaron a temperatura ambiente, seleccionando una velocidad de 60 nm/min y anchuras de rendija de 5 mm para excitación y emisión. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 280 nm, a la que se excitan tanto tirosinas como triptófanos. Se registró la emisión de fluorescencia entre 285 y 450 nm. Las muestras tenían una concentración de 80 μ g/ml.

8.5. Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular de DAAO se obtuvieron usando un espectropolarímetro J-715 (JASCO, Japón) entre 200 y 250 nm. Con la muestra (97 μ g/ml) en una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico se registró el dicroísmo circular con una velocidad de barrido de 50 nm/min a temperatura ambiente. Los espectros finales son el resultado de promediar 4 observaciones (realizadas frente a una línea base de disolvente) a temperatura ambiente.

La elipticidad molar por residuo se calculó usando 110 Da como peso molecular promedio. La predicción de estructura secundaria se llevó a cabo usando el programa Anthepro.

8.6. Análisis de la secuencia de aminoácidos

La secuencia de aminoácidos de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*, publicada durante el desarrollo del presente trabajo (Faotto y col.,1995), fue analizada usando las herramientas informáticas disponibles con el fin de conjugar los datos experimentales con las predicciones estructurales basadas en la estructura primaria de la proteína.

El análisis de la secuencia de aminoácidos y el alineamiento con las secuencias de otras proteínas se realizaron usando los programas Editseq, Protean y Megalign del paquete de software LaserGene (DnaStar Inc., Brighton, EEUU) (Clewley, 1995; Plasterer, 1997). Las predicciones de estructura secundaria usaron los métodos de análisis que se detallan a continuación :

Método de Chou y Fasman

Este algoritmo predice la estructura secundaria de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos. Se trata de un procedimiento estadístico basado en estructuras cristalográficas conocidas. El método original examinaba las estructuras de 15 proteínas (2473 residuos) y consideraba la frecuencia de aparición de cada residuo en hélice α , lámina β o giro β . Más tarde, Chou y Fasman (1978) extendieron el análisis a 29 estructuras (4741 residuos), y posteriormente Chou (1990) lo amplió a 64 estructuras y cuatro clases de proteínas : 'alfa' (gran proporción en hélice α : hemoglobinas, citocromos, etc.) , 'beta' (gran proporción en lámina β : inmunoglobulinas, serín-proteasas, etc.), 'alfa+beta' (contienen tanto estructura α como β , en dominios separados : ferredoxina, ribonucleasa, etc.) y 'alfa/beta' (con carácter alterno α y β y con dominios mixtos : deshidrogenasas, quinasas, etc.). El parámetro por defecto en el análisis, que fue el elegido en nuestro caso, es el de '64 proteínas' sin división en clases. El principio del método es simple : usando el parámetro conformacional se encuentran sitios de nucleación de hélices o láminas que se extienden por ambos extremos hasta encontrar un segmento de secuencia

con mayor tendencia a formar un tipo distinto de estructura. Las regiones de giro son aquellas que contienen residuos que no son generadores de hélice ni lámina.

Los parámetros de umbral de decisión usados en el análisis fueron los propuestos por los autores (Chou y Fasman, 1978) para el método '64 proteínas', es decir, un valor de 1.03 para el umbral de región α (P_α) y de 1.05 para el de β (P_β).

Este método tiene la limitación de basarse en probabilidades determinadas a partir de las estructuras de 64 proteínas. Si la secuencia de interés difiere significativamente de las incluidas en esta selección, la fiabilidad del resultado puede reducirse. Se ha calculado una precisión del 80% para las predicciones obtenidas por este método.

Método de Garnier y Robson

También es un enfoque estadístico basado en los datos cristalográficos de 25 proteínas usando específicamente los ángulos diédricos ϕ y ψ (C'-N-C-C'-N) y los arreglos de puentes de hidrógeno para definir regiones como α -helicoidales (H), β -laminares (E), giros β (T) o madeja aleatoria (C) (Garnier y col., 1978). Este método examina la propensión de un determinado residuo a encontrarse incluido en un tipo de estructura secundaria y, si los 16 residuos circundantes (8 hacia cada extremo) favorecen también la adopción de ese tipo de conformación, se le asigna dicha estructura.

Los únicos parámetros a definir en este análisis son las constantes de decisión. En nuestro caso se permitió al programa calcular estas constantes sobre la base de los datos de tres clases de proteínas : con menos de 20%, entre 20 y 50% y con más de 50% de hélice α o lámina β .

Método de Hopp y Woods

Este método (Hopp y Woods, 1981) pretende encontrar determinantes antigénicos buscando en secuencias proteicas las áreas de mayor hidrofilia. Con esto, los autores asumen en primer lugar que los determinantes antigénicos se hallan típicamente en regiones expuestas al disolvente y en segundo lugar que las cadenas laterales hidrofílicas cargadas son frecuentes en los determinantes antigénicos. A cada residuo se le asigna un valor de hidrofilia y estos valores son promediados en un marco hexamérico o heptamérico que recorre la secuencia problema. En nuestro análisis se usó una ventana de 7 residuos para cada promedio.

La principal limitación de este método es que no siempre la antigenicidad se correlaciona con la hidrofilia. Aquí, una vez más, si nuestra secuencia de interés difiere significativamente de las que se usaron para asignar los valores de hidrofilia, las predicciones son menos fiables.

Método de Kyte y Doolittle

Este procedimiento (Kyte y Doolittle, 1982) permite la predicción de hidropatía regional de una proteína a partir de su secuencia. La hidropatía se define como la afinidad por el agua (valores positivos corresponden a carácter hidrofílico y negativos a hidrofóbico). Se asignan valores de hidropatía a los distintos residuos y estos valores se promedian en un marco definido por el usuario. El valor promedio se representa en el punto medio de la ventana definida. Estos valores son derivados de las energías libres de transferencia agua-vapor y de la distribución interior-exterior típica de las cadenas laterales. En este análisis se usó un marco de 11 residuos siguiendo las recomendaciones de los autores.

Método de Jameson y Wolf

Efectúa una predicción de determinantes antigénicos potenciales mediante una combinación de los métodos existentes de predicción estructural. El algoritmo (Jameson y Wolf, 1988) contiene seis subrutinas principales. En la primera etapa, los valores de hidrofilia se determinan por el método de Hoop-Woods. En la segunda, las probabilidades de superficie se calculan por el método de Emini. A continuación se aplica el procedimiento de Karplus-Schultz para la predicción de flexibilidad de cadena. Los pasos cuarto y quinto se ejecutan las rutinas de Chou-Fasman y Garnier-Robson. En la última fase todos los factores anteriormente calculados de flexibilidad, hidropatía y accesibilidad al disolvente se combinan para determinar un valor de probabilidad superficial llamado el índice antigénico. Después de la determinación de este índice, se aplica una función de ensanchamiento en la que a los principales picos se les añade un 20, 40, 60 u 80% del su valor con el fin de considerar la energía libre adicional derivada de la movilidad de regiones exteriores con respecto a las interiores. Esta modificación se aplica a todos los picos principales excepto a aquellos que ocurren en el interior de hélices, ya que estas tienden a ser menos flexibles.

Método del momento hidrofóbico de Eisenberg

Los momentos hidrofóbicos son cantidades semi-empíricas basadas en medidas experimentales y computerizadas que describen la distribución de residuos hidrofílicos e hidrofóbicos en una proteína (Eisenberg y col., 1984). Describen la asimetría de la hidrofobia, también llamada anfifilia. El momento hidrofóbico estructural (cuando se conocen las coordenadas atómicas) está dado por :

$$\mu_s = \sum H_n s_n \quad (2)$$

donde n es el número de residuos, H_n es la hidrofobia del residuo en posición n y s_n es un vector unitario que apunta desde el carbono α hacia el centro de la cadena lateral de ese residuo. El momento hidrofóbico es pues la suma de vectores de cada una de las cadenas laterales ponderadas según su hidrofobia. El momento hidrofóbico de la secuencia es usado por el programa para estimar el momento hidrofóbico en ausencia de datos atómicos. Está dado por :

$$\mu_H = [(\sum H_n \sin(\delta_n))^2 + (\sum H_n \cos(\delta_n))^2]^{1/2} \quad (3)$$

Todas las variables son idénticas a las de la ecuación anterior y δ es el ángulo (en radianes) con el que las sucesivas cadenas laterales emanan del eje central de la estructura. Los valores por defecto son 100° para una α -hélice y 170° para una lámina β . La predicción se realizó usando estos valores predeterminados y un marco de 11 residuos para promediar cada vez.

También se llevó a cabo una búsqueda de homología entre la estructura primaria de esta proteína y la de otras incluidas en una base de datos de secuencias proteicas no redundante que contiene 80,584,101 residuos en 269,819 secuencias. Esta base de datos incluye, entre otras, la colección de proteínas SwissProt (Bairoch y Boeckmann, 1991), las secuencias del Protein Data Bank (Brookhaven National Library) y las traducciones de las secuencias génicas codificadoras de Genbank (NCBI, EEUU). La búsqueda de secuencias homólogas se llevó a cabo usando el algoritmo BLASTP (Altschul y col., 1990) del servicio de red del National Center for Biotechnology Information (NCBI, EEUU).

Las comparaciones de secuencia entre esta proteína y otras oxidasas se llevó a cabo utilizando el programa Megalign del paquete Lasergene (DNASTAR, Inc., Brighton, EEUU). Para el alineamiento de las diferentes secuencias se usó el método

CLUSTAL V (Higgins y Sharp, 1989) con la tabla de ponderación de residuos PAM250.

La predicción y análisis de estructura terciaria se hicieron con el servidor de modelamiento automatizado de proteínas SwissModel (Peitsch, 1995; Peitsch, 1996). El programa de modelamiento molecular usó los datos de difracción de rayos X de diversas flavoproteínas para proponer una estructura tridimensional de la DAAO de *Rhodotorula gracilis* remitida (secuencia completa, 368 residuos) y truncó los 4 primeros residuos (-NH terminales), así como los 89 últimos (-COOH terminales) por no disponer de suficiente información para incluirlos en el modelo propuesto. La visualización del modelo obtenido se consiguió mediante el programa RasMol.

9. ESTUDIO DE LA UNIÓN DEL FAD

La determinación de la constante de disociación del FAD de la apoproteína y la caracterización del proceso de unión son pasos obligados en el estudio de la DAAO como biocatalizador industrial y como flavoproteína modelo.

9.1. Determinación de la constante de disociación

El apantallamiento de la fluorescencia del FAD que acompaña a su combinación con apo-DAAO fue utilizado para determinar su constante de disociación. Sobre 2 ml de una solución de apoproteína 247 nM (según titulación de sitios de unión de FAD) en una cubeta de cuarzo de 1 x 1 cm de paso óptico a 25°C se añadieron sucesivas cantidades de FAD hasta una concentración de 1 μ M registrando tras cada adición la intensidad de fluorescencia flavínica ($\lambda_{exc}=450$ nm; $\lambda_{emis}=530$ nm) con rendijas de 5 y 10 nm para los haces de excitación y emisión, respectivamente. La dilución provocada por cada adición de FAD fue corregida para finalmente someter los datos al análisis necesario para deducir la constante de disociación.

Al representar los datos corregidos de fluorescencia flavínica frente a la concentración de FAD se debe obtener una curva con dos porciones rectas separadas por una región de inflexión. La primera recta responde a la intensidad de fluorescencia del FAD unido a apoproteína, que es menor que la correspondiente al FAD libre (segunda zona recta). La inflexión entre ambos segmentos rectos debe estar situada sobre la concentración de FAD que iguala a la de apoproteína presente en la mezcla.

Los puntos del gráfico que se encuentran en esa zona de inflexión son los que pueden usarse para la determinación de la constante de disociación. El método original (Stinson, 1973) usa un fluorímetro diferencial de haz separado y registra las diferencias de fluorescencia del cofactor añadido por igual a dos cubetas, una de las cuales contiene una solución de apoproteína y la otra el mismo volumen del tampón correspondiente. La Figura 12 muestra la evolución típica de la fluorescencia en cada cubeta, así como de la diferencia entre ambas.

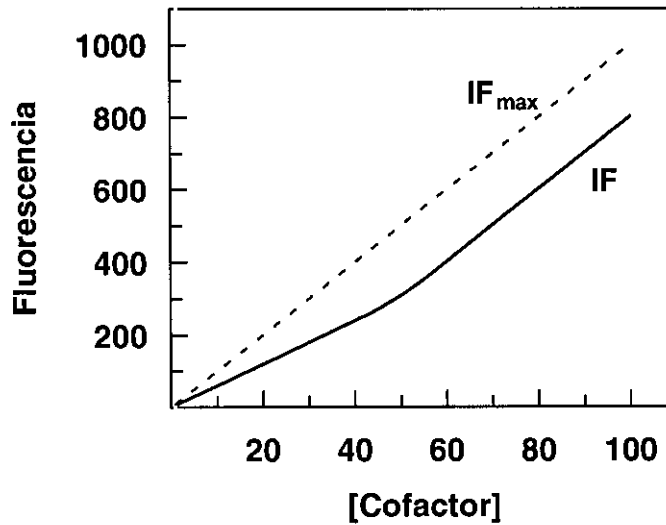
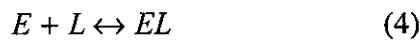


Figura 12. Seguimiento de la unión del cofactor por fluorimetría diferencial. La intensidad de fluorescencia (IF) del cofactor se mide tras sucesivas adiciones sobre una solución de apoproteína (con una concentración de 50 en esta simulación) en comparación con idénticas adiciones sobre tampón (IF_{max}).

La saturación fraccional (α) de los sitios de unión de cofactor presentes en la muestra puede igualarse al cociente $\Delta IF / \Delta IF_{\max}$ donde ΔIF_{\max} es el valor límite de incremento de fluorescencia (ΔIF) alcanzado a altas concentraciones de cofactor añadido. La concentración de ligando unido ($[EL]$) se relaciona con la concentración de sitios de unión desocupados ($[E]$) y la concentración de ligando libre ($[L]$) mediante la ley de acción de masas y una constante de disociación ($K_{E,L}$).



$$[EL] = \alpha [E]_0 \quad (5)$$

$$[L] = [L]_0 - \alpha [E]_0 \quad (6)$$

$$\frac{K_{E,L}}{(1 - \alpha)} = \frac{[L]_0}{\alpha} - [E]_0 \quad (7)$$

De esta forma, una representación gráfica de $1/(1 - \alpha)$ frente a $[L]_0/\alpha$ será una recta con una pendiente de $1/K_{E,L}$ y un intercepto de $[L]_0/\alpha = [E]_0$ cuando $1/(1 - \alpha) = 0$. El método tiene la ventaja de que pequeños errores a la hora de determinar ΔIF_{\max} se reflejan curvando dicha representación, lo que permite un refinamiento del cálculo hasta que se obtiene la recta esperada.

En el presente trabajo experimental, al haberse usado un fluorímetro de haz simple, las adiciones sucesivas de FAD se efectuaron sobre una sola cubeta y las

diferencias de fluorescencia se calcularon sobre la base de la pendiente de la curva a altas concentraciones de FAD, es decir, cuando todos los sitios de unión están ya ocupados y los incrementos de fluorescencia corresponden al FAD libre, sin apantallamiento (ΔIF_{\max}).

9.2. Caracterización de la unión del cofactor

Usando un fluorímetro MPF-44E de Perkin-Elmer (Connecticut, EEUU), se llevó a cabo un seguimiento temporal del apantallamiento de la fluorescencia proteica ($\lambda_{\text{exc}}=285 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emis}}=335 \text{ nm}$) tras la mezcla de soluciones de apoproteína y FAD. Sobre una cubeta de cuarzo de 1 x 1 cm de paso óptico con 1.5 ml de apoproteína 83.3 nM (determinada por titulación de centros de unión de FAD) en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 8.0 se añadieron 500 μl de una solución de FAD 10 μM e inmediatamente se registró la disminución de la intensidad de fluorescencia proteica con el tiempo.

Con el fin de relacionar los cambios en la fluorescencia proteica observados durante la asociación del FAD y la apoproteína con la aparición de actividad enzimática que acompaña a este proceso se llevó a cabo un experimento similar en un espectrofotómetro de flujo detenido ('stopped-flow') de Hi-Tech (Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) asociado a un ordenador con coprocesador matemático, una tarjeta de conversión analógico/digital y un programa (IS-1 Software Suite, versión 1.0) suministrado por el fabricante del equipo. Una de las dos jeringas de reactivo se cargó con una solución de apoproteína 125 nM en tampón fosfato potásico 100 mM a pH 8.0 y la otra con FAD 5 μM y D-fenilglicina 1 mM. El voltaje que hubo que aplicar al fotomultiplicador para ajustar correctamente los niveles máximos de absorbancia y transmitancia fue de 580 V. Tras efectuar varios (aprox. 6) disparos de 50 μl por jeringa con el software en modo 'osciloscopio' y el monocromador ajustado a 252 nm (con 1 mm de rendija), los trazos obtenidos se hacían repetitivos y podían usarse para el análisis matemático. El amplificador asociado al fotomultiplicador está dotado de un selector de constante temporal que actúa como filtro de ruido de fondo y en este experimento el ajuste se hizo a 33 μs , que es el intervalo temporal en que el instrumento promedia la señal para generar cada punto de la traza.

10. ESTUDIOS DE LA INACTIVACIÓN POR H_2O_2

El H_2O_2 es un producto de la reacción catalizada por DAAO pero, además, produce inactivación de la enzima. Este aspecto es de gran relevancia desde el punto de vista industrial pues en el proceso de oxidación de cefalosporina C por DAAO en bioreactores las cantidades de H_2O_2 formadas pueden ser relativamente altas y conducir a la destrucción paulatina de la actividad enzimática.

10.1. Estudios de inhibición por producto

Cuando se estudiaron las inhibiciones por los productos H_2O_2 y ácido pirúvico, la velocidad de la reacción fue determinada en mezclas de reacción que contenían hasta 10 mM de D-alanina y 10 mM de inhibidor. El análisis cinético de los datos fue llevado a cabo usando el programa SigmaPlot 4.0 (SPSS Inc.,).

La ausencia de descarboxilación oxidativa por H_2O_2 del α -oxoácido formado fue comprobada por incubación de soluciones de piruvato 250 μ M con H_2O_2 5 y 50 mM a temperatura ambiente y comparación de los espectros de las correspondientes 2,4-dinitrofenilhidrazonas.

10.2. Modificación química

10.2.1. Cinética de inactivación

Soluciones de apo- y holoenzima 0.7 μ M fueron incubadas a 30°C con varias concentraciones de H_2O_2 en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 8.0 y a diferentes tiempos se retiró el H_2O_2 de las mezclas por adición de catalasa 0.2 mg/ml en tampón de ensayo. La actividad enzimática fue entonces medida por el procedimiento habitual. En el caso de la apoenzima, antes del ensayo, se reconstituía la holoenzima por adición de FAD. La concentración de H_2O_2 en las soluciones de almacenamiento fue confirmada espectrofotométricamente a 240 nm usando un coeficiente de extinción molar de 43.6 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$.

Los experimentos de protección fueron llevados a cabo preincubando DAAO 0.7 μ M (en sus formas apo- y holo-) con D-alanina 10 mM or benzoato 10 mM en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 8.0 durante 10 minutos. La inactivación con H_2O_2 era entonces iniciada.

10.2.2. Valoración de cisteínas

10.2.2.1. Análisis de aminoácidos

Muestras de 500 μ l (13 μ g) de apoproteína fueron tratadas con H_2O_2 10 y 50 mM durante 12 horas a 30°C. Estas muestras, junto con controles no tratados, se sometieron a una oxidación con ácidos fórmico y perfórmico para convertir todas las cisteínas en ácido cisteico. El ácido perfórmico se preparó mezclando ácido fórmico al 94% y H_2O_2 al 35% en una relación 9:1 y manteniendo esta mezcla 2.5 horas a temperatura ambiente y 15 minutos en baño de hielo. La oxidación de cisteínas se lleva a cabo añadiendo 1.25 μ l de ácido fórmico al 94% y 2 μ l de la solución recién preparada de ácido perfórmico y manteniendo 2.5 horas en baño de hielo. Finalmente, se desecan las muestras por centrifugación al vacío y se someten a hidrólisis ácida y análisis automático de aminoácidos como se ha descrito en la pág.40.

10.2.2.2. Reacción con DTNB

Muestras de 200 μ l de apoproteína y holoenzima con una concentración 1 μ M a las que se había retirado el β -mercaptoetanol fueron tratadas con H_2O_2 20 y 50 mM durante 30 minutos y 12 horas, respectivamente a 30°C por triplicado. Como controles se incluyeron muestras a las que se añadía agua en vez de H_2O_2 . A continuación, se determinó el contenido tiólico de cada muestra añadiendo 5 μ l de una solución de DTNB 10 mM en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 8.0, incubando 5 minutos a temperatura ambiente y registrando espectros de absorbancia entre 520 y 300 nm a una velocidad de 600 nm/min. El color desarrollado por la reacción del DTNB con tioles libres es estable entre 5 minutos y una hora a temperatura ambiente y puede cuantificarse en torno a 420 nm (Ellman, 1959; Shah y col., 1995).

10.2.3. Valoración de metioninas

La oxidación de metioninas y posterior valoración se realizaron usando un método basado en el descrito por Caldwell y col. (1978).

Preparaciones de holoenzima y apoproteína 12.5 μ M fueron sometidas a oxidación con H_2O_2 50 y 20 mM durante 12 horas y 30 minutos, respectivamente a 30 °C para conseguir en ambos casos una completa inactivación. Como controles, se trataron idénticas muestras en las mismas condiciones sustituyendo el H_2O_2 por agua. Las soluciones resultantes se pasaron por columnas PD-10 de penetrabilidad equilibradas con agua y los eluidos proteicos se liofilizaron.

Las muestras se redisolviéron (5.8 μ M) usando una solución de 8 M urea y ácido iodo- $[^{14}C]$ -acético 2.32 mM (7.57 Ci/mol) ajustada con HCl a pH 3.0. La alquilación se condujo a 40°C durante 24 horas en la oscuridad y a continuación se hicieron pasar las muestras por filtros Millipore con un límite de 5000 Da, lavando posteriormente dichos filtros 3 veces con agua y una con etanol absoluto. Una vez secados, los filtros se

colocaron en viales de centelleo con 10 ml de líquido de centelleo Ready Safe y se contaron en un contador TriCarb de Packard usando un protocolo diseñado para ^{14}C .

10.2.4. Valoración de triptófanos

Las propiedades espectroscópicas del triptófano facilitan el seguimiento de las modificaciones de este tipo de residuos. El triptófano es uno de los residuos susceptibles de oxidación por peróxido de hidrógeno a pH's básicos, por esto se procedió a comprobar si la pérdida de actividad observada en experimentos de tratamiento con H_2O_2 podía deberse a la oxidación de uno o varios residuos de triptófano esenciales.

10.2.4.1. Espectroscopía de fluorescencia

Se registraron los espectros de fluorescencia de la apoenzima y la holoenzima después de su oxidación con H_2O_2 a pH 7.5. Se prepararon soluciones de 200 μl de apoenzima y holoenzima (1 μM) y se sometieron a oxidación con H_2O_2 . La apoenzima se incubó con una concentración final de 20 mM durante 30 minutos y la holoenzima con una concentración final de 50 mM durante 12 horas. Ambas se incubaron en baño a 30°C. Se utilizaron como controles muestras idénticas de apoenzima y holoenzima sustituyendo el H_2O_2 por agua.

Tras la incubación, se eliminó el H_2O_2 del medio pasando las muestras a través de columnas de 1 ml de Sephadex G-25 semi-seco. Posteriormente se registraron los espectros de fluorescencia. Estos se registraron en un espectrofluorímetro MPF-44E de Perkin-Elmer. Se excitaron las muestras a 280 nm (5 mm de rendija) y se registró la emisión desde 250 nm a 450 nm (5 mm de rendija). La velocidad de barrido fue de 60 nm/min, la anchura de rendija de 5 mm en ambos casos. Las muestras se analizaron en una cubeta de 600 μl de 1 cm de paso óptico y a temperatura ambiente.

10.2.4.2. Espectroscopía de absorción

Se registraron los espectros de diferencia de la apoenzima tratada con H_2O_2 ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{final}}=20$ mM, 30 minutos, 30°C) frente a la apoenzima control (con agua en lugar de H_2O_2) y de la holoenzima tratada con H_2O_2 ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{final}}=50$ mM, 12 horas, 30°C) frente a la holoenzima control. Los espectros se registraron en un espectrofotómetro DU-70 de Beckman a temperatura ambiente y con una velocidad de barrido de 600 nm/min.

10.2.5. Caracterización de la unión del FAD a la DAAO modificada

Una solución de apoproteína 2.37 μM fue tratada con H_2O_2 20 mM durante 30 minutos a 30°C y otra idéntica se incubó en las mismas condiciones con igual volumen de agua. A continuación se determinó la constante de disociación del FAD y se estudió la cinética del proceso de unión del cofactor en las enzimas control y oxidada siguiendo los procedimientos que se ha descrito con anterioridad (pág.44). Adicionalmente, se

registraron espectros de absorción de luz y de emisión de fluorescencia de la holoenzima reconstituida tras la oxidación.

10.2.6. Cromatografía de penetrabilidad en HPLC

La posible afección del proceso de dimerización por la oxidación previa se estudió analizando soluciones de apoproteína y holoenzima $2.37 \mu\text{M}$ antes y después de su tratamiento con el agente oxidante mediante HPLC. Las muestras de apoproteína se incubaban con exceso de FAD tras su oxidación para permitir la reconstitución de la holoenzima antes de inyectarlas en la columna. La columna fue de Biosep-Sec 3000 y estaba equilibrada con tampón fosfato potásico 50 mM con EDTA 2 mM a pH 7.5.

11. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO QUÍMICO

11.1. Estudios de variación de pH

El efecto de la concentración de hidrogeniones sobre la actividad de enzimas es muy similar al de activadores o inhibidores y los mismos fundamentos teóricos pueden aplicarse en este caso, si bien el parecido queda a menudo enmascarado por el uso frecuente de escalas logarítmicas (pH) para la concentración de iones hidrógeno. Este tratamiento puede aportar información sobre el mecanismo cinético de la reacción. Por otra parte, las ionizaciones características de las cadenas laterales de diferentes aminoácidos permiten la identificación de residuos con un papel importante en la catálisis. Este último aspecto suele considerarse el más importante, pero en realidad los dos enfoques son complementarios y tratar de identificar grupos esenciales sin tener en cuenta los aspectos cinéticos no sólo resulta en la pérdida de datos valiosos, sino que además puede llevar a conclusiones erróneas.

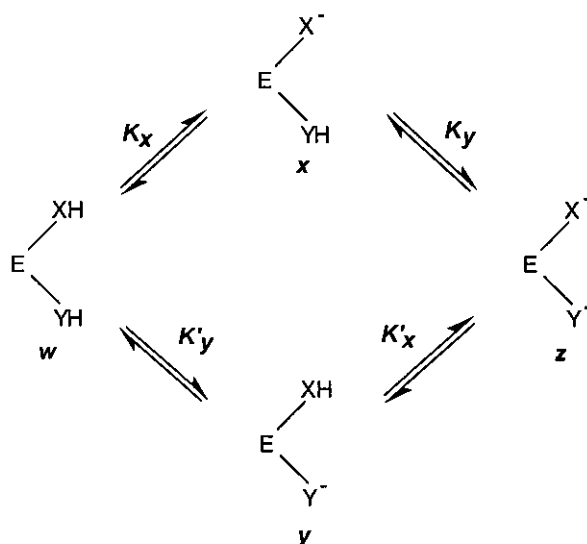


Figura 13. Equilibrios entre los posibles estados de ionización de una enzima con dos grupos esenciales ionizables.

Aunque las enzimas suelen contener numerosos grupos ionizables, la variación de la velocidad inicial con el pH frecuentemente tiene una forma acampanada, lo que puede explicarse como el resultado de la presencia de dos grupos ionizables esenciales para la actividad. Este modelo puede parecer una simplificación excesiva, pero suele ocurrir que la mayor parte de las ionizaciones son indetectables en este tipo de estudios por afectar sólo al equilibrio entre especies enzimáticas inactivas. Si este modelo simple fuese correcto, la enzima puede considerarse un ácido dibásico (Figura 13) y las ecuaciones que describen las ionizaciones de este tipo de compuestos son un buen punto de partida.

Las concentraciones de las diferentes especies pueden expresarse en función de las constantes :

$$x = wK_x / [H^+] \quad (8)$$

$$y = wK_y / [H^+] \quad (9)$$

$$z = xK'_y / [H^+] \quad (10)$$

$$z = yK'_x / [H^+] \quad (11)$$

Sólo se requieren 3 de las constantes para definir las concentraciones, ya que de (8) y (10), se deduce :

$$z = wK_xK'_y / [H^+]^2 \quad (12)$$

y de (9) y (11) :

$$z = wK'_xK_y / [H^+]^2 \quad (13)$$

de forma que de (12) y (13) :

$$K_xK'_y = K'_xK_y \quad (14)$$

por lo que fijando tres de las constantes de disociación, la cuarta queda definida. Aunque tanto K_x como K'_x se refieren a la disociación de un protón del mismo grupo (XH), no son idénticas. Normalmente, K_x será mayor que K'_x ya que la carga negativa en el otro grupo (Y^-) puede ayudar a retener el protón en XH. No obstante, K'_x puede superar a K_x por resultar la pérdida del protón de XH favorecida tras la del de YH por un cambio conformacional, o bien por la unión de un ion metálico multivalente cuya mayor carga positiva rechace el protón de XH. Los mismos razonamientos pueden aplicarse a K_y y K'_y .

La concentración total del ácido dibásico, e, estará dada por :

$$e = w + x + y + z \quad (15)$$

Y las concentraciones de cada especie iónica pueden expresarse :

$$w = \frac{e}{1 + [(K_x + K_y) / [H^+]] + K_xK'_y/[H^+]^2} \quad (16)$$

$$x = \frac{e K_x / [H^+]}{1 + [(K_x + K_y) / [H^+]] + K_x K'_y / [H^+]^2} \quad (17)$$

$$y = \frac{e K_y / [H^+]}{1 + [(K_x + K_y) / [H^+]] + K_x K'_y / [H^+]^2} \quad (18)$$

$$w = \frac{e K_x K'_y / [H^+]^2}{1 + [(K_x + K_y) / [H^+]] + K_x K'_y / [H^+]^2} \quad (19)$$

De las ecuaciones (17) y (18) se deduce que el cociente de las concentraciones de las dos especies monoprotonadas está dado por :

$$x/y = K_x/K_y \quad (20)$$

y es independiente del pH, por lo que cualquier cambio en la concentración de una de estas especies estará acompañado por un cambio proporcional en la otra. Como no es posible saber la aportación a un efecto de una de estas especies aisladamente, es preferible tratarlas como una sola especie cuya concentración es :

$$w = \frac{e K_x K'_y / [H^+]^2}{1 + [(K_x + K_y) / [H^+]] + K_x K'_y / [H^+]^2} \quad (21)$$

donde

$$K_A = K_x + K_y = [H^+](x + y)/w \quad (22)$$

y

$$K_B = K_x K'_y / (K_x + K_y) = [H^+]z/(x + y) \quad (23)$$

De las ecuaciones (14), (22) y (23) :

$$K_A K_B = K_x K'_y = K'_x K_y \quad (24)$$

A las constantes K_A y K_B se les denomina constantes *moleculares* de disociación para distinguirlas de las constantes de disociación *de grupo*. Sólo las constantes moleculares pueden medirse experimentalmente, si bien las constantes de grupo pueden deducirse por analogía (Dixon, 1976). K_A es la constante de disociación del primer protón eliminado, independientemente de la contribución de cada especie (XH y YH) y K_B es la del segundo protón. Como sólo pueden determinarse experimentalmente las constantes moleculares, es conveniente expresar las concentraciones de las otras dos especies, en estos términos también :

$$w = \frac{e}{1 + K_A / [H^+] + K_A K_B / [H^+]^2} \quad (25)$$

$$z = \frac{e}{1 + [\text{H}^+] / K_B + [\text{H}^+]^2 / K_A K_B} \quad (26)$$

Las curvas teóricas de variación de concentraciones relativas de cada especie con el pH serían como indica la Figura 14.

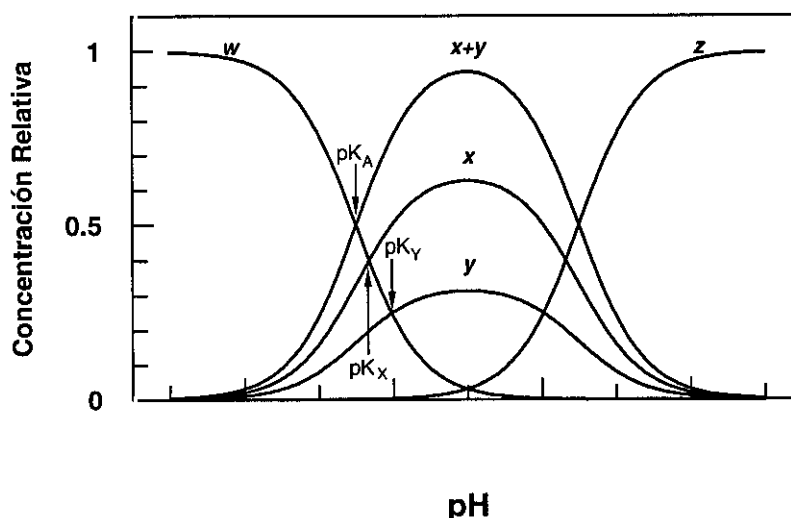


Figura 14. Curvas teóricas de variación de concentraciones relativas de las diferentes especies iónicas de un ácido dibásico.

Si el ácido dibásico en cuestión es una enzima que es activa en una o más formas iónicas y que pierde su actividad por protonación o desprotonación, entonces se deduce de la ecuación (21) que la velocidad de la reacción catalizada, v , varía con $[\text{H}^+]$ según la ecuación

$$v = \frac{ke}{1 + [\text{H}^+] / K_A + K_B / [\text{H}^+]} \quad (27)$$

Siempre que K_A sea mucho mayor que K_B , no habrá ninguna $[\text{H}^+]$ a la que tanto $[\text{H}^+]/K_A$ como $K_B/[\text{H}^+]$ sean apreciables, es decir, no se observará cooperatividad entre las dos ionizaciones y los valores de K_A y K_B corresponderán a los valores de $[\text{H}^+]$ que produzcan la mitad de la velocidad máxima. Como las velocidades se representan más frecuentemente frente a pH que frente a $[\text{H}^+]$, es mejor usar los valores de pK ($-\log K$) antes que K_A y K_B como tales. Consecuentemente, si $pK_B \gg pK_A$ (3.5 unidades al menos), pK_A y pK_B son los valores de pH a los que la actividad es la mitad de la máxima. El máximo de la curva se sitúa siempre a un pH que es igual a $(pK_A + pK_B)/2$. No obstante, según se acercan los valores de pK_A y pK_B , se va perdiendo la correspondencia entre los pK 's y los puntos de altura media de la curva. Cuando la diferencia entre los dos pK 's es inferior a 0.6, las dos protonaciones muestran cooperatividad positiva y la cantidad de especies monoprotonadas es despreciable.

Aunque las constantes obtenidas son moleculares, a menudo pueden interpretarse como constantes de grupo. Las ionizaciones de grupos tan estrechamente vinculados que

ambos afectan la catálisis deben afectarse también mutuamente, por lo que no podemos asumir que $K_X = K'_X$. No obstante, K_X y K_Y pueden diferir apreciablemente, por ejemplo siendo $K_X \gg K_Y$. Entonces $x \gg y$ y K_A se aproximará a K_X , así como K_B a K'_Y . Un aminoácido típico ejemplifica esto (Figura 15).

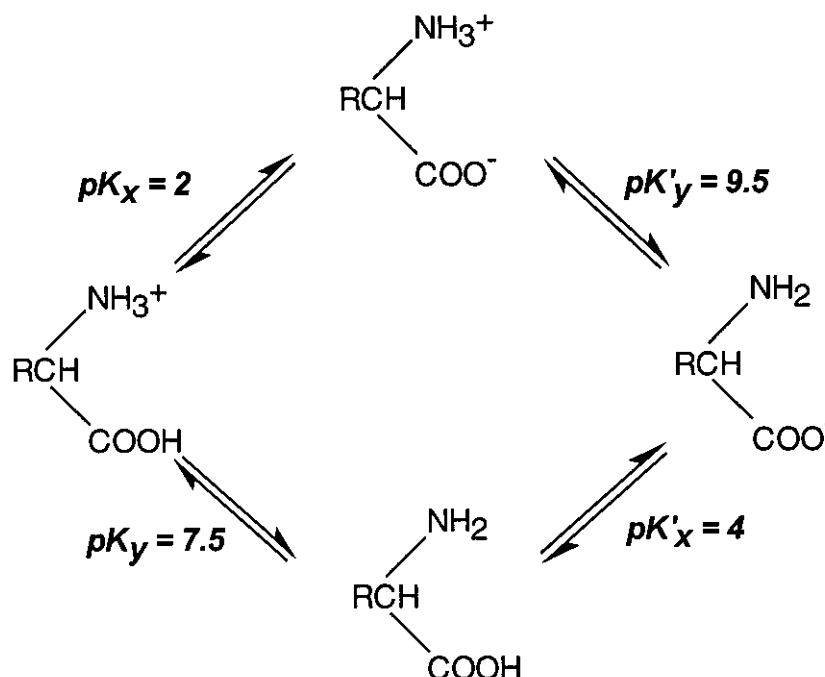


Figura 15. Equilibrios entre las diferentes especies iónicas de un aminoácido típico

Existen evidencias de la predominancia del zwitterión sobre la forma no cargada, por lo que el pK_A de 2 observado en la primera desprotonación puede identificarse como el pK_X de la disociación del protón carboxílico en la especie que tiene el grupo amino protonado. De forma similar, el pK_B de 9.5 detectado para la segunda desprotonación puede atribuirse al pK'_Y del grupo amino en la especie con el carboxilo disociado. Por analogía con otros ácidos, podemos establecer pK'_X en torno a 4, lo que fija pK_Y alrededor de 7.5, valor razonable para un grupo amino con la atracción electrónica de un carboxilo no disociado en la vecindad.

La determinación de los pK 's que afectan la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima no basta para la identificación de los papeles de diferentes residuos en la función de la enzima. Los cambios en el pH pueden afectar tanto a la constante de Michaelis (K_M) como a la velocidad máxima (V_{\max}) de la reacción. Dado que ambos parámetros son afectados por el pH, los valores de pK aparentes a una concentración arbitraria de sustrato no tienen por qué corresponder a ionizaciones individuales. Por esto, si pretendemos obtener información útil, debemos investigar el efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de la reacción estudiada.

En el presente estudio se han analizado las variaciones con el pH de los parámetros cinéticos de la oxidación de D-alanina catalizada por DAAO en diferentes condiciones con el objeto de obtener información que permita establecer hipótesis

relativas a la identidad de los residuos esenciales en la unión de sustrato y la catálisis y, en general, al mecanismo químico de dicha reacción (Ramon y col., 1998).

Los sistemas de tampones (fosfato/pirofosfato y MES/Bis-Tris-propano) usados en estos estudios fueron preparados con ajustes de fuerza iónica usando un programa escrito en Basic y desarrollado en nuestro laboratorio que permite visualizar la capacidad tamponadora a cada pH de sistemas hasta de 4 especies tetrapótricas y calcula la cantidad de NaCl a añadir en cada caso para conseguir igualdad de fuerza iónica a todos los pH's.

11.1.1. Efecto del pH sobre la cinética de la reacción con D-alanina

La variación con el pH (5.4-12.0) de los parámetros cinéticos se estudió en un sistema de tampones ácido-neutros compuesto por fosfato potásico y pirofosfato sódico 50/50 mM y también en otro de tampones catiónicos con MES y Bis-Tris-Propano 50/50 mM en el intervalo de temperaturas 20-45°C. La enzima es estable en todas las condiciones incluidas en estos experimentos. La fuerza iónica a cada pH fue ajustada a 250 mM mediante adición de las cantidades necesarias de NaCl.

Los resultados expuestos en las figuras y tablas corresponden a promedios de experimentos realizados por triplicado.

Los valores de las constantes cinéticas se determinaron mediante el ajuste de los datos de cinéticas de saturación a la ecuación

$$v = \frac{V_{\max} S}{K_M + S} \quad (28)$$

donde v y V_{\max} son las velocidades inicial y máxima respectivamente, K_M la constante de Michaelis y S la concentración de sustrato.

Los datos de perfiles que mostraban una disminución en $\log V$ o $\log V/K_M$ con una pendiente de 1 cuando disminuye el pH y de -1 cuando aumenta fueron ajustados a la ecuación

$$Y = \frac{C}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad (29)$$

donde K_1 y K_2 las constantes de disociación de grupos que deben estar desprotonado y protonado respectivamente para la actividad, Y es V_{\max} o V_{\max}/K_M y C es el valor de Y alcanzado en el estado óptimo de protonación.

11.1.2. Variación de la K_i de un inhibidor competitivo con el pH

La dependencia de K_i del pH fue analizada usando ácido D-aspartico como inhibidor competitivo de DAAO. Los ensayos se realizaron a varias concentraciones de D-alanina (0.1 a 10 mM) variando la concentración de ácido D-aspartico desde 0 hasta 13 mM, a 35°C durante 10 minutos.

Las constantes de inhibición se calcularon mediante ajuste de las velocidades iniciales así obtenidas a la ecuación

$$v = \frac{V_{max}S}{K_M(1 + I/K_i) + S} \quad (30)$$

donde I es la concentración de inhibidor y K_i la constante de inhibición.

Los valores de pK_i para el ácido D-aspartico como inhibidor competitivo se representaron frente al pH y el pK del grupo implicado en la unión de inhibidor se extrajo del ajuste de los puntos experimentales a la ecuación

$$Y = \frac{C}{1 + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad (31)$$

donde Y es el pK_i , C es el valor al que tiende Y en el estado óptimo de ionización y K_2 es la constante de disociación del grupo que debe estar desprotonado para la unión del inhibidor.

11.1.3. Efecto de la alteración de la constante dieléctrica del medio

Los estudios de perturbación con disolventes se realizaron por adición de dimetilsulfóxido (DMSO) al 20% (v/v) sobre las mezclas de reacción tanto en sistemas de tampones ácido-neutros como en los catiónicos. Los valores de pH expresados en las figuras corresponden a los de las mezclas de reacción antes de añadir el disolvente. La adición de DMSO al 20% no provocó pérdida de actividad enzimática.

11.1.4. Efecto de la temperatura sobre los pK 's: Entalpías de ionización

Las entalpías de ionización de los residuos de la enzima fueron determinadas ajustando los valores de pK obtenidos de los perfiles de pH a diferentes temperaturas a la ecuación

$$pK = \frac{\Delta H_{ion}}{2.3 \cdot R \cdot T} \quad (32)$$

donde ΔH_{ion} es la entalpía de disociación, R la constante de gases y T la temperatura absoluta.

11.2. Estudios de modificación química

11.2.1. Modificación de argininas con fenilglioxal

Muestras de DAAO (2.5 µg) en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7.5 fueron tratadas con diferentes concentraciones (0.1-2.0 mM) de fenilglioxal durante 30 minutos a 25°C. Tras la modificación, se ensayó la actividad enzimática residual usando el ensayo con D-fenilglicina.

11.2.2. Modificación de lisinas con TNBS

El estudio de la inactivación de lisinas por TNBS se llevó a cabo de forma idéntica a la empleada en el caso de la inactivación de argininas por fenilglioxal.

11.2.3. Modificación de cisteínas con PHMB

Sobre alícuotas de 25 µl (2.5 µg) de enzima se añadieron 100 µl de soluciones con diferentes concentraciones de PHMB en tampón fosfato potásico/pirofosfato sódico 25/25 mM a pH 8.8. La reacción de modificación se llevó a cabo a 25°C durante 30 minutos y se paró mediante adición de 50 µl de tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7.5 y enfriamiento en baño de hielo y a continuación se determinó la actividad residual mediante el ensayo con D-fenilglicina.

11.2.4. Modificación de tirosinas con tetranitrometano y N-acetilimidazol

Para llevar a cabo la modificación con TNM, se preincubaron 25 µl de una solución enzimática 4,67 µM con 5 µl de una solución etanólica de TNM a distintas concentraciones en un volumen final de 50 µl. Como controles se utilizaron mezclas en las que se sustituyó el modificador por etanol. Las reacciones se condujeron a 20°C durante 30 minutos. La reacción de modificación se detuvo añadiendo 10 µl de β-mercaptoetanol 180 mM en tampón de ensayo (fosfato potásico 50 mM, pH 8) y poniendo los tubos en hielo.

En el caso de la modificación con N-acetilimidazol, sobre una solución enzimática 4,67 µM se añadieron 50 µl de una solución del modificador en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5 a distintas concentraciones en un volumen final de 100 µl. Las muestras se incubaron a 30°C durante 20 minutos. La reacción de modificación se detuvo por adición de L-Tyr 9 mM en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 8.

En ambos casos la actividad enzimática de las muestras se ensayó con D-fenilglicina.

11.2.5. Modificación de histidinas con dietilpirocarbonato (DEP)

La gradual descomposición del DEP en las soluciones almacenadas hace necesaria la determinación de la concentración real cada vez que se va a hacer uso de ellas. Estas determinaciones se efectuaron siguiendo el método de Miles (1977). 100 μl de la solución etanólica de DEP eran añadidos sobre 1.9 ml de histidina 5.5 mM. La concentración de DEP se calculó usando un coeficiente de extinción molar de $3200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 242 nm para la histidina carboxilada.

11.2.5.1. Cinética de descomposición del DEP

Dada la baja estabilidad del DEP en soluciones acuosas, antes de abordar los estudios de cinética de inactivación se caracterizó la cinética de descomposición del reactivo en las diferentes condiciones de modificación.

300 μl de soluciones etanólicas de DEP (10 y 20 mM) fueron incubadas a 30°C con 2.7 ml de fosfato potásico 50 mM a pH 7.5, así como con 2.7 ml de un sistema de tampones fosfato/pirofosfato 50/50 mM a diferentes valores de pH. A diferentes tiempos de incubación se retiraron alícuotas de 200 μl que se añadían sobre 0.8 ml de histidina 5.5 mM para determinar la concentración efectiva de DEP como se ha descrito anteriormente. Las velocidades de hidrólisis de DEP en las diferentes condiciones fueron calculadas y usadas para la corrección correspondiente al análisis de la cinética de inactivación de DAAO por DEP.

El tratamiento matemático de los datos de inactivación para corregir el sesgo que introduce la descomposición del reactivo se hizo de acuerdo al método de Topham (1985). Los datos se representan como A/A_0 frente a t' . A/A_0 es la actividad residual fraccional a un tiempo t y t' se usa para corregir la hidrólisis del DEP de acuerdo con

$$t' = (1 - e^{-k't}) / k' \quad (33)$$

donde k' es la constante de velocidad de primer orden de la hidrólisis del DEP.

11.2.5.2. Cinética de inactivación

Muestras de 2.5 μg de DAAO en 100 μl de tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7.5 fueron incubadas durante 20 minutos a 30°C con 6.2 μl de una solución etanólica de DEP a la concentración adecuada a cada experimento. La concentración de etanol en la mezcla no superaba el 5% (v/v) y se comprobó que no tenía efecto observable sobre la actividad o la estabilidad de la enzima. La reacción con DEP se detuvo por enfriamiento en hielo y el exceso de DEP se eliminaba haciendo pasar las mezclas de reacción por columnas de Sephadex G-25 semi-seco. La actividad de cada muestra se determinaba tras la adición de D-fenilglicina 25 mM en las condiciones típicas de ensayo.

De la representación semilogarítmica de actividad residual fraccional frente al tiempo corregido se extrajeron las constantes de pseudo primer orden (k_{app}), que en una representación secundaria frente al logaritmo de la concentración de DEP permitieron la determinación de la constante de velocidad de segundo orden (k) :

$$\log k_{app} = \log k + n \log [DEP] \quad (34)$$

La cinética de modificación se estudió también usando los espectros diferenciales de absorción de luz ultravioleta de las mezclas de inactivación respecto a mezclas de referencia en las que, en lugar de modificador, se añadía etanol. Las constantes de velocidad de pseudo primer orden se extrajeron en este caso de la representación semilogarítmica de $1-A/A_0$ frente al tiempo corregido (t'). A/A_0 es el cociente de absorbancias a 242 nm de la mezcla de modificación y su correspondiente solución de referencia. La constante de velocidad de segundo orden se determinó de igual manera que en el seguimiento de actividad residual.

11.2.5.3. Cálculo del número de histidinas esenciales

La inactivación de DAAO por DEP se correlacionó con el número de residuos de histidina modificados, que se calcularon por espectroscopía diferencial a 242 nm usando un coeficiente de extinción molar de $3200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para la histidina carboxilada y un peso molecular de 37500 para la DAAO. De esta forma se determinó la cantidad de residuos modificados una vez que la inactivación es completa. El número de residuos esenciales puede calcularse por el método de Tsou (1962), que incluye el ajuste de los datos a la siguiente ecuación :

$$\log[(nx/(A/A_0)^{1/i}) - p] = \log(n-p) + [(a-1)/i] \cdot \log(A/A_0) \quad (35)$$

donde n es el número total de residuos modificables de los cuáles p reaccionan a una velocidad definida (k_1). Estos últimos incluyen i residuos esenciales. Los $(n-p)$ restantes reaccionan a una velocidad diferente ($k_2 = ak_1$) y x es la fracción total de residuos no modificados en un momento dado de la modificación. Una representación de $\log[(nx/(A/A_0)^{1/i}) - p]$ frente a $\log(A/A_0)$ debe ser una línea recta para valores positivos de n , p e i .

11.2.5.4. Dependencia del pH

Con el objeto de aportar evidencias adicionales de la identidad del tipo de residuo modificado en estos estudios, se estudió la dependencia del pH de la inactivación por DEP. La cinética de inactivación se estudió a diferentes valores de pH (6.2-10.2) usando el sistema de tampones fosfato/pirofosfato 50/50 mM. Las constantes de velocidad de pseudo primer orden obtenidas se representaron frente a la concentración de hidrogeniones de acuerdo a la siguiente ecuación :

$$1/k_{app} = 1/k_2 + [H^+]/(k_2 \cdot K_a) \quad (36)$$

donde k_{app} es la constante de inactivación de pseudo primer orden a cada pH, k_2 es la constante de pseudo primer orden de modificación de la histidina desprotonada y K_a es la constante aparente de disociación de la forma ácida de la enzima. Del intercepto y la pendiente de dicha representación se deducen los valores de k_2 y pK_a .

11.2.5.5. Reversión de la modificación

La enzima modificada con DEP fue reactivada por adición de hidroxilamina 1 M a pH 7.0 o NaOH 100 mM. Muestras de DAAO pura (20 μ g) fueron incubadas en presencia de DEP 1 mM en 0.5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7.5 durante 20 minutos a 30°C. A continuación se añadió un volumen igual de hidroxilamina 1M a pH 7.0 o de NaOH 100 mM y la mezcla se incubó a 30°C. A diferentes tiempos se retiraron alícuotas de 125 μ l de las que se determinó la actividad enzimática tras la retirada de la hidroxilamina por desalado en columnas de Sephadex G-25 semi-seco o bien la neutralización de la sosa con una cantidad equivalente de HCl. La estabilidad de la enzima en las soluciones usadas para la reversión de la inactivación había sido previamente confirmada.

11.2.5.6. Estudios de protección

Los estudios de protección se llevaron a cabo mediante preincubación de la enzima con D-fenilglicina 2.5 mM o benzoato sódico 3.6 mM en 100 μ l de fosfato potásico 50 mM a pH 7.5 durante 5 minutos a 30°C. A continuación se añadían 5 μ l de DEP 1 mM y se conducía la inactivación tal como se ha descrito anteriormente.

11.2.6. Modificación de triptófanos con *N*-bromosuccinimida (NBS)

La modificación química de proteínas con NBS se ha usado para la discriminación entre diferentes estados de los residuos de triptófano y para la exploración de su papel en la función catalítica de enzimas. La DAAO nativa de *Rhodotorula gracilis* contiene 8 residuos de triptófano por monómero.

11.2.6.1. Cinética de inactivación

Muestras de DAAO (apo- y holo-) 0,152 μ M en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 8.0 se preincubaron con distintas concentraciones de NBS. A diferentes tiempos, se retiraron alícuotas en las que se detuvo la reacción de modificación por adición de 60 mM L-triptófano y 180 mM β -mercaptoetanol en el mismo tampón. La actividad residual se determinó entonces con 10 mM D-alanina en condiciones típicas de ensayo. De la representación gráfica de los logaritmos de actividad residual frente al tiempo se extrajeron las constantes de pseudo primer orden que, en representación secundaria frente al logaritmo de la concentración de NBS permitieron la determinación de las constantes de segundo orden para ambas especies.

11.2.6.2. Espectroscopía de absorción

La oxidación de residuos de Trp por NBS se puede seguir espectroscópicamente por la disminución de la absorbancia a 280 nm (Spande y Witkop, 1967). Se realizaron espectros de diferencia de las muestras tratadas frente a las muestras sin tratar, tanto para la apoproteína como para la holoenzima.

Sobre una muestra de 95 μl de DAAO (holo- o apo-) 7.2 μM en una microcubeta de cuarzo (100 μl , 1 cm de paso óptico) se añadieron 5 μl de una solución de NBS 500 μM y, tras un minuto, se registró un espectro de absorbancia de luz ultravioleta entre 230 y 330 nm. A continuación se efectuaron más adiciones idénticas, retirando antes de cada una 5 μl de la mezcla para mantener siempre un volumen de lectura de 100 μl , hasta alcanzar una concentración de 300 μM de NBS en la cubeta. Tras comprobar que la alteración del espectro correspondía a la modificación de triptófanos y no de tirosinas, se calculó en cada caso el cociente $[\text{NBS}]/[\text{Trp}]$, teniendo en cuenta que la DAAO posee 8 residuos de triptófano y se representó la disminución de absorbancia a 280 nm frente a este cociente. El número de Trp oxidados (n_{Wox}) en cada ciclo se calculó usando la ecuación empírica propuesta por Spande y Witkop (1967):

$$n_{\text{Wox}} = -\Delta A_{280} \cdot 1.31 / (5500 \cdot [E]_m) \quad (37)$$

donde ΔA_{280} es la diferencia de absorbancia a 280 nm entre la proteína modificada y el control, 1.31 es un factor de corrección empírico, 5500 es el coeficiente de extinción molar del Trp (280 nm, 1 cm) y $[E]_m$ es la concentración de proteína tras m ciclos de modificación. En cada ciclo, la muestra sufre una dilución 95/100 por lo que $[E]_m = [E]_0 \cdot (0.95)^m$.

11.2.6.3. Espectrofluorimetría

Con el fin de ahondar en la caracterización de la modificación, se registraron espectros de emisión de fluorescencia entre 250 y 450 nm excitando a 280 nm de muestras tratadas con NBS como ya se ha descrito (cinéticas de inactivación). Dichos espectros se obtuvieron usando un espectrofluorímetro PERKIN-ELMER MPF-44E con una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico y a temperatura ambiente.

11.2.6.4. Estudios de protección

Con el fin de determinar el posible efecto protector de diferentes sustratos o análogos de sustrato, se preincubaron muestras de 15 μl de apoproteína u holoenzima 474 nM con 15 μl de D-alanina 20 mM, cefalosporina C 40 mM o benzoato sódico 20 mM durante 10 minutos a 30°C. A continuación se añadieron 15 μl de diferentes concentraciones de NBS y incubaron las mezclas durante 30 minutos a 20°C. Las reacciones de modificación se detuvieron añadiendo 5 μl de una solución con L-triptófano 60 mM y β -mercaptoetanol 180 mM en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 8.0. La actividad residual se midió con D-alanina siguiendo el procedimiento típico de valoración de grupos ceto.

11.2.6.5. Cromatografía de penetrabilidad en HPLC

La posible afección del proceso de dimerización por la modificación previa de triptófanos con NBS se estudió analizando soluciones de apoproteína y holoenzima antes y después de su modificación con el reactivo de triptófanos mediante HPLC. Muestras de 110 μ l de apoproteína u holoenzima 2.37 μ M se incubaron con 10 μ l de una solución acuosa de NBS 1.4 mM durante 30 minutos a 20 °C. Las muestras control (no tratadas) se obtuvieron añadiendo agua en lugar de NBS y, adicionalmente se preparó una muestra de apoproteína tratada con NBS y posteriormente reconstituida con FAD 16.6 μ M en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7.5 durante 5 minutos a 4°C. En una columna de HPLC Biosep-Sec 3000 equilibrada con fosfato potásico 50 mM y EDTA 2 mM a pH 8.0 se inyectaron 100 μ l de cada una de las muestras mencionadas y se registraron los cromatogramas a 280 nm con un flujo de 1 ml/min de la fase móvil usada para equilibrar la columna.

También se analizó la dimerización de la DAAO antes y después de la modificación con NBS mediante electroforesis en condiciones nativas. Sobre un gel al 5% de poliacrilamida en tampón Tris-HCl a pH 8.3 con glicina 129 mM se llevó a cabo la separación de las diferentes formas oligoméricas presentes en las mezclas descritas en el experimento anterior (separación por HPLC). La tinción de proteínas se llevó a cabo con Azul de Coomassie R-250, mientras que la tinción de actividad se realizó incubando los geles con D-alanina y cloruro de iodonitrotetrazolio según se ha descrito anteriormente (pág.38).

La constante de disociación del FAD de la apoproteína modificada con NBS se determinó como se ha descrito anteriormente (pág.44) para compararla con la correspondiente a la apoproteína no tratada.

RESULTADOS

1. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DAAO

1.1. Curva de crecimiento y producción

La fermentación de *Rhodotorula gracilis* en medio de inducción fue caracterizada analizando muestras de 10 ml tomadas de un fermentador con 10 litros de medio inoculado con 250 ml de suspensión celular con una A_{660} de 2.0 y mantenido a 30°C durante 75 horas. Las variaciones de pH no fueron corregidas a lo largo de la fermentación, si bien el medio está tamponado con MES 25 mM a pH 5.6. La presión de oxígeno (pO_2) se mantuvo entre 50 y 100% con un flujo de aire estéril de 10 l/min y una agitación variable entre 150 y 750 r.p.m.. La evolución de diferentes parámetros de interés a lo largo de la fermentación se muestra en las figuras 16-21.

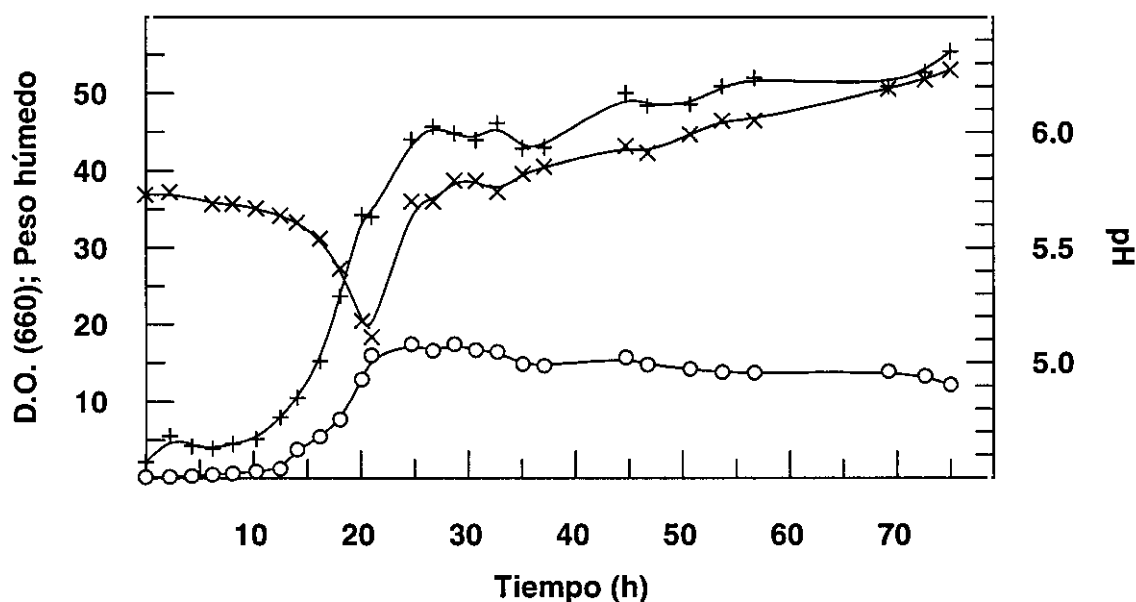


Figura 16. Variación de biomasa y pH con el tiempo de fermentación. La densidad óptica a 660 nm (o), el peso húmedo en g/l (+) y el pH (x) fueron determinados en muestras de 10 ml tomadas a lo largo de la fermentación.

Tanto los datos de densidad óptica a 660 nm como de peso húmedo indican una fase de latencia de aproximadamente 10 horas seguida de una de crecimiento exponencial de cerca de 15 horas que deja paso a una fase estacionaria en la que, a juzgar por los datos de densidad óptica, la autólisis da cuenta de una ligera caída en la concentración celular. El pH desciende algo más de media unidad durante la fase de crecimiento exponencial como consecuencia del acelerado metabolismo primario presente en esta etapa y aumenta ligera pero constantemente hasta 6.6 durante la fase estacionaria en la que el metabolismo secundario se hace dominante y aparecen los característicos pigmentos rojos.

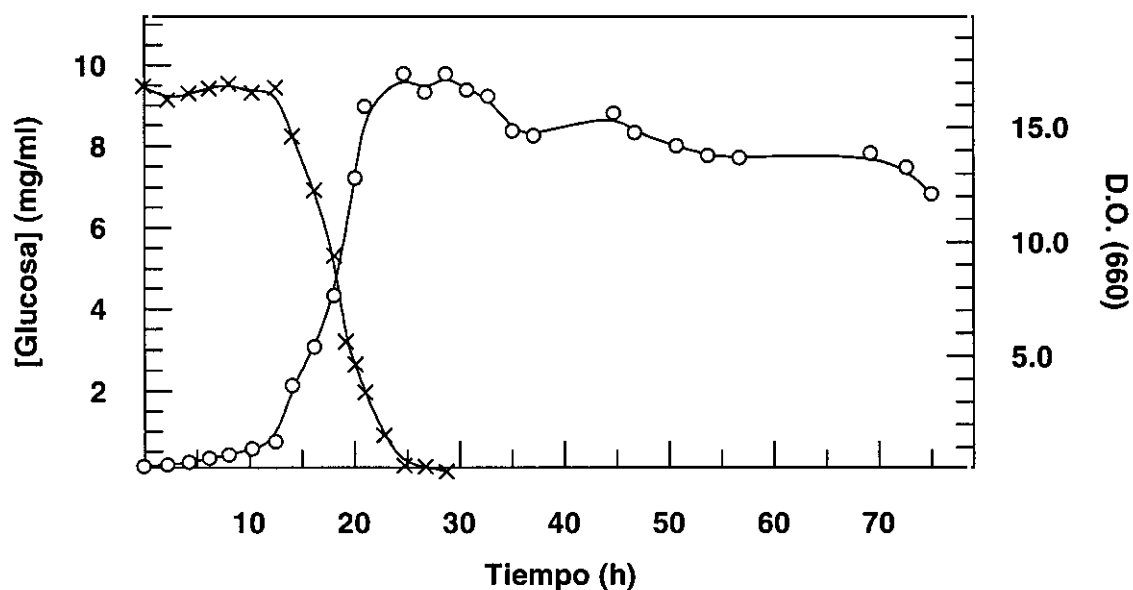


Figura 17. Consumo de glucosa durante el crecimiento del cultivo. La concentración de glucosa (mg/ml) (x) fue determinada en las tomas de 10 ml y se representa junto a la densidad óptica a 660 nm (o).

La concentración de glucosa se mantiene prácticamente inalterada durante las 10 primeras horas coincidiendo con la fase de latencia y se consume en su totalidad en el transcurso de la fase de crecimiento exponencial.

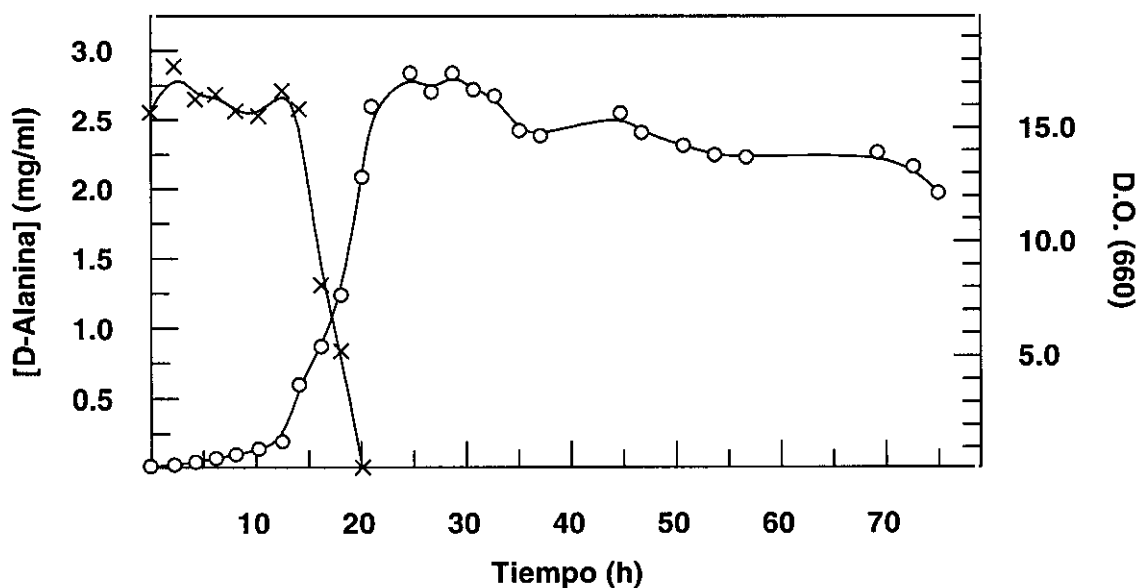


Figura 18. Consumo de D-alanina durante el crecimiento del cultivo. La concentración de D-alanina (mg/ml) (x) fue determinada en las tomas de 10 ml y se representa junto a la densidad óptica a 660 nm (o).

Al igual que ocurre con la glucosa, la D-alanina es consumida en su totalidad durante la fase de crecimiento exponencial. El agotamiento simultáneo de las fuentes de carbono y nitrógeno determina claramente el final del crecimiento exponencial y el cambio a un metabolismo secundario.

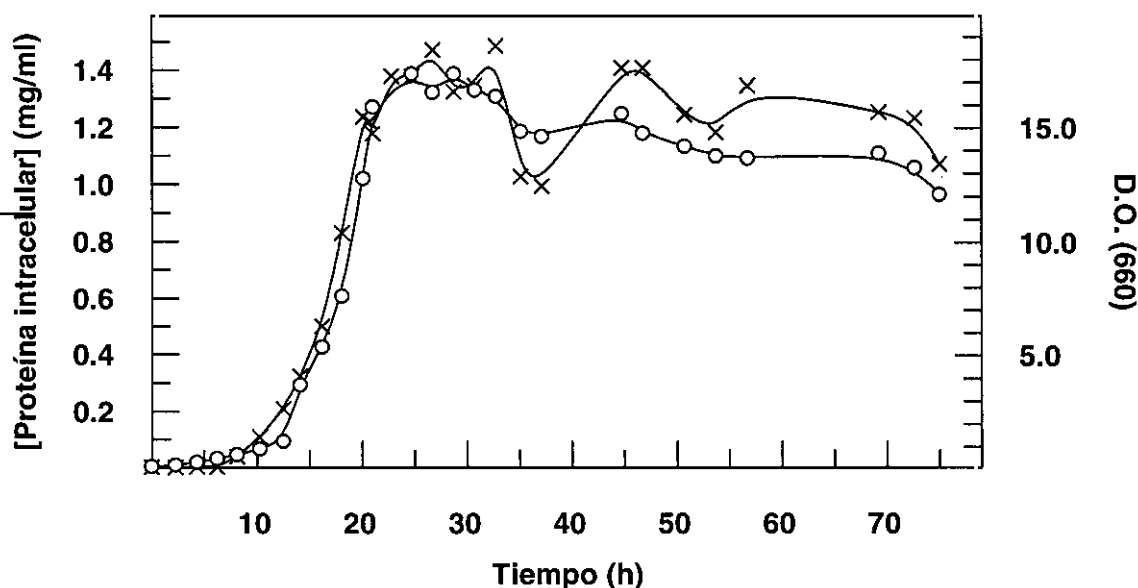


Figura 19. Proteína total intracelular a lo largo de la fermentación. La concentración de proteína intracelular (mg/ml) (x) fue determinada en las tomas de 10 ml y se representa junto a la densidad óptica a 660 nm (o).

La concentración de proteína intracelular presente en el cultivo a los diferentes tiempos de fermentación evoluciona en paralelo con la densidad óptica a 660 nm.

Al calcular la cantidad de proteína por célula (Figura 20) se hace evidente que la síntesis de proteínas sufre un incremento notable antes de que la multiplicación celular se haga evidente. De hecho, a partir de las 6-7 horas, el contenido proteico por unidad celular se eleva bruscamente para luego descender y estabilizarse a partir de las 15 horas, es decir, a mitad de la fase exponencial.

La tasa específica de crecimiento (μ_g) fue hallada según el modelo de crecimiento exponencial. De acuerdo con este modelo:

$$\mu_g = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{d \ln X}{dt} \quad (38) \quad \text{ó} \quad \mu_g = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} = \frac{d \ln N}{dt} \quad (39)$$

donde X es la masa celular por unidad de volumen y N es el número de células por unidad de volumen. La fase de crecimiento exponencial puede linealizarse representando el logaritmo de la medida de masa celular ($D.O._{660}$) o de concentración

celular (células/nl) frente al tiempo de fermentación y la pendiente de la recta será la tasa específica de crecimiento. El valor así obtenido fue de 0.21.

Los coeficientes de rendimiento en biomasa (Y) con respecto a los diferentes sustratos estudiados (glucosa y D-alanina) se calcularon para la fase exponencial:

$$Y_{X/\text{glucosa}} = 0.80$$

$$Y_{X/\text{D-alanina}} = 1.94$$

Las tasas específicas de consumo de sustrato se calcularon en base a la siguiente expresión:

$$q_s = \mu / Y_{XS} \quad (40)$$

Los valores hallados para nuestra fermentación fueron :

$$q_{\text{D-Ala}} = 0,11$$

$$q_{\text{glucosa}} = 0,26$$

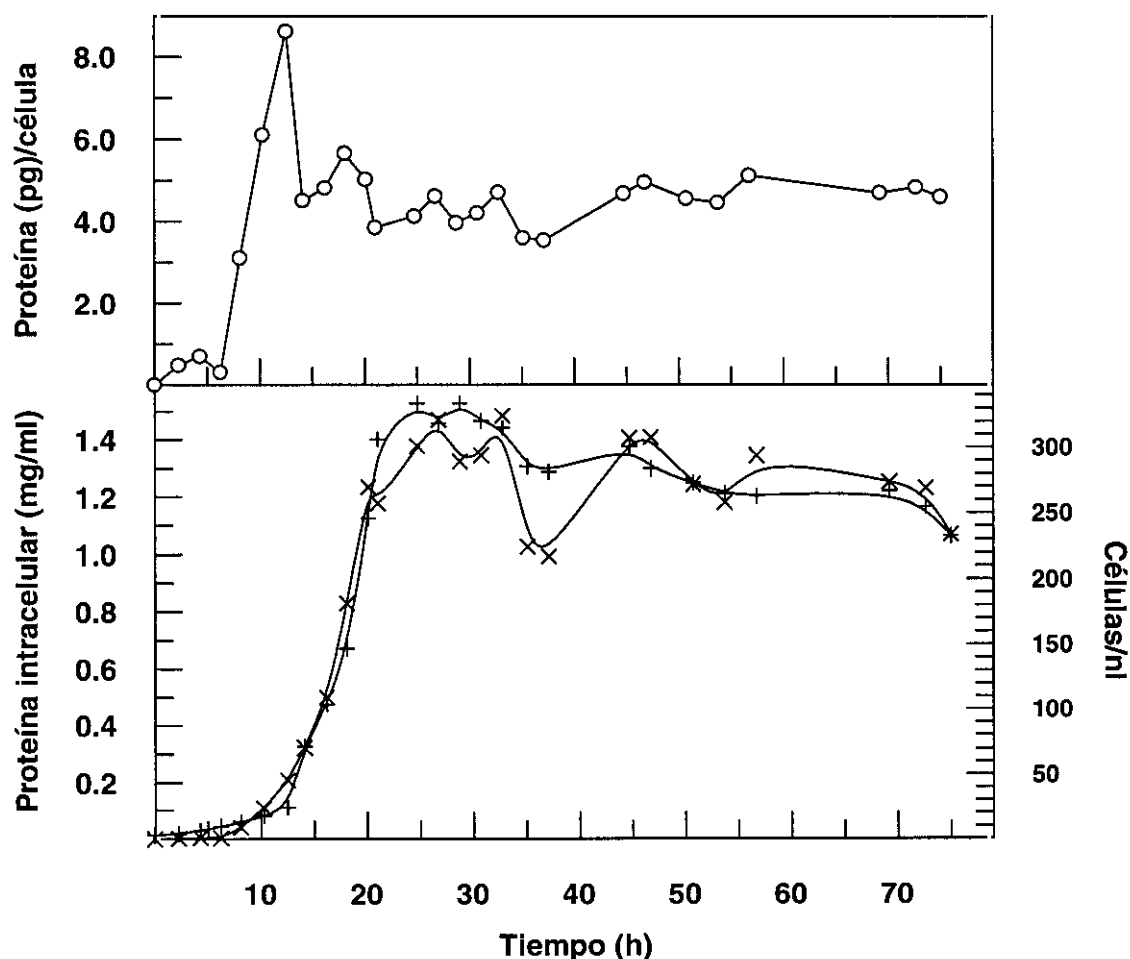


Figura 20. Contenido proteico intracelular. Los datos de concentración de proteína intracelular (mg/ml) (x) y los de concentración celular (células/nl) (+) se usaron para calcular la cantidad de proteína (pg) por célula (o).

La actividad específica alcanza un máximo al finalizar la fase exponencial y decae a continuación hasta cerca de un 20% del valor máximo a las 70 horas (Figura 21). Esta disminución de la actividad DAAO respecto a la cantidad total de proteína puede responder a la degradación por proteasas y la desnaturalización térmica una vez que la D-alanina ha sido totalmente consumida. La producción de enzima, por tanto, está asociada al crecimiento.

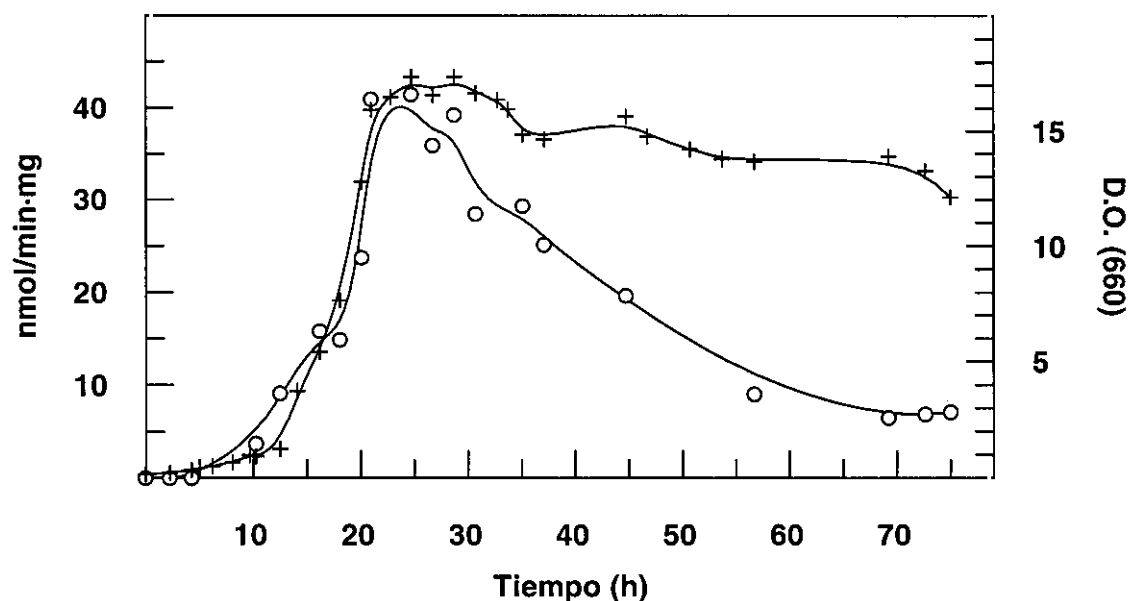


Figura 21. Actividad específica de DAAO en el extracto crudo. La actividad específica (nmol/min·mg) (o) se representa junto a la curva de crecimiento (+).

El rendimiento de producto respecto a biomasa ($Y_{P/X}$) fue de 8.42 y la tasa específica de aparición de producto fue:

$$q_P = \mu / Y_{X/P} = \mu \cdot Y_{P/X} = 1.78$$

Los rendimientos de producto respecto a los sustratos en la fase exponencial fueron:

$$Y_{P/D-Ala} = 16,33$$

$$Y_{P/Glucosa} = 6,73$$

1.2. Ruptura/permeabilización de la pared celular.

La pared celular de *Rhodotorula gracilis* consta de múltiples capas y se han descrito (Kocková-Kratochvílová y Holan, 1976) engrosamientos anormales durante el envejecimiento que dificultan su ruptura por los métodos más habituales de homogeneización de cultivos de levadura. Por esto, resulta importante retirar los cultivos tan pronto finaliza la fase de crecimiento exponencial.

Con objeto de identificar el método de ruptura/permeabilización más adecuado para la obtención de extractos con una mayor actividad específica se probaron diversos procedimientos descritos en la literatura. La Tabla 3 muestra la eficacia de cada método descrito en 'Materiales y Métodos' (pág.28)

Tabla 3. Eficacia de diferentes métodos de ruptura/permeabilización de la pared de *Rhodotorula gracilis* para la extracción de DAAO. UA : unidades de actividad ($\mu\text{mol(BFA)}/\text{min}$); A.E. : actividad específica (UA/mg(proteína))

<u>Método</u>	<u>Proteína</u> <u>(mg/ml)</u>	<u>Actividad</u> <u>(UA/ml)</u>	<u>A.E.</u>
Liofilización/maceración/agitación con perlas de vidrio	13.3	6.70	0.50
Congelación/descongelación repetida	2.9	2.42	0.84
Sonicación	1.7	0.55	0.32
Agitación con perlas de vidrio	1.2	0.37	0.31
French Press	6.5	3.25	0.50
Autólisis con tolueno	2.6	0.78	0.30
Liofilización/maceración con perlas de vidrio	4.1	2.82	0.69
Litica (A. luteus)	0.7	0.33	0.47
Enzimas líticas (R. solani)	0.1	0.04	0.42

El método que propició una mayor ruptura celular fue el de liofilización/maceración/ agitación con perlas de vidrio si tenemos en cuenta la cantidad de proteína solubilizada, la actividad extraída y la observación microscópica. Por esta razón, en el análisis de tomas de cultivos se usó este método. No obstante, de cara a la purificación de la DAAO, interesaba más partir de un extracto con elevada actividad específica pues en los intentos de aislamiento usando extractos 'totales' la preparación enzimática mostraba una menor estabilidad y se dificultaba notablemente la obtención de DAAO electroforéticamente pura.

Los dos métodos que se usaron más frecuentemente en la preparación de extractos para purificación de DAAO fueron el de congelación/descongelación reiteradas y el de liofilización/maceración con perlas de vidrio. El primero rendía una mayor pureza inicial pero extraía algo menos de actividad y consumía mucho tiempo, mientras que el segundo era relativamente rápido y, aunque conducía a una preparación con una actividad específica algo menor tenía una mayor eficacia de extracción.

La ruptura en prensa hidráulica (French Press) proporcionaba extractos con una actividad específica inicial insuficiente para el éxito de la purificación. La pobre estabilidad de las preparaciones así obtenidas podría deberse a degradación por proteasas a pesar de la adición de PMSF (que sólo inactiva serín-proteasas).

Otros métodos típicamente eficaces en la degradación de la pared de levaduras resultaron llamativamente inoperantes en el caso de *Rhodotorula gracilis* a pesar de la vigilancia mantenida sobre el momento de retirada de los cultivos para evitar el envejecimiento y consiguiente engrosamiento de las paredes.

1.3. Mejora de la estabilidad a 4°C

Durante la preincubación de mezclas enzimáticas a 4°C se observó una pérdida diaria de actividad de cerca de 8.5 % de la actividad inicial en ausencia de efectores.

La Tabla 4 muestra las eficacias de estabilización de los diferentes efectores en el tiempo de preincubación a 4°C, así como las concentraciones a las que la adición resultaba más beneficiosa.

Tabla 4. Estabilización de preparaciones impuras de DAAO por diferentes aditivos a 4°C. El factor de estabilización se ha calculado dividiendo la actividad residual tras 180 horas en presencia del aditivo por la correspondiente en su ausencia.

Efactor	Concentración óptima	Factor de estabilización
Etanol	6.25 % (v/v)	2.21
Metanol	12.5 % (v/v)	2.28
Isopropanol	12.5 % (v/v)	2.04
Glicerol	6.25 % (v/v)	1.93
Dimetilsulfóxido	3.13 % (v/v)	1.71
Polietilenglicol 3500	25.0 % (p/v)	1.38
Polietilenglicol 6000	25.0 % (p/v)	1.28
Benzamidina	50 mM	1.65
Fosfato potásico pH 7.5	27.5 mM	1.51
FAD	1.25 µM	2.06
D-Alanina	25 mM	1.46

La presencia de PMSF hasta 50 mM no tuvo efecto sobre la estabilidad, mientras que la benzamidina, otro inhibidor de serín-proteasas, estabiliza significativamente la solución de DAAO. La rápida degradación del PMSF en soluciones acuosas puede estar en la base de esta diferencia de capacidad protectora entre ambos compuestos.

Llama la atención el hecho de que el β-mercaptoetanol, descrito como estabilizador de la enzima, demostró en nuestra experiencia ser, más bien al contrario, un acelerador de la pérdida de actividad a todas las concentraciones probadas. Otro agente reductor, el ditiotreitól fue aún más potente en la destrucción de actividad DAAO a lo largo de la preincubación. También el ácido ascórbico produjo una inactivación rápida de la solución enzimática.

El EDTA (2 mM), incluido en los tampones de extracción y purificación en los trabajos previamente publicados, lejos de estabilizar la solución de DAAO, aumenta significativamente la velocidad de desnaturalización desde concentraciones relativamente bajas (156 μ M). Su empleo en la preparación de extractos a partir de la pasta celular puede justificarse por su acción preventiva de proteólisis por metaloproteasas liberadas al medio junto a la DAAO, pero su presencia en los tampones de purificación parece indeseable.

El glicerol al 10 % (v/v) propuesto por Simonetta y col. (1987) para estabilizar las preparaciones de DAAO parece, a la luz de ese experimento, una opción acertada.

El fosfato también estabiliza la DAAO pero, a concentraciones superiores a 25 mM, su efecto sobre la fuerza iónica resultante propicia la pérdida de actividad enzimática. La disminución de la estabilidad causada por incremento de la fuerza iónica se pone claramente de manifiesto en el caso del cloruro sódico, cuyo efecto perjudicial se hace visible en las concentraciones superiores a 50 mM.

El FAD demostró ser un eficaz estabilizador de DAAO, razón por la cuál se decidió incluirlo (1 μ M) en las soluciones de DAAO para su almacenamiento, así como en las etapas de purificación de gran duración.

En lo que se refiere a estabilización por sustrato, la D-alanina muestra un claro efecto protector, pero no ocurre lo mismo en el caso de la cefalosporina C, que induce pérdidas de actividad desde la mínima concentración probada (156 μ M).

1.4. Purificación de DAAO

1.4.1. Purificación a partir de cultivos de *Rhodotorula gracilis*

La purificación de la enzima se llevó a cabo mediante una modificación del protocolo descrito por Pollegioni y col. (1992). La Tabla 5 muestra la secuencia de etapas en la purificación a partir de células de *Rhodotorula gracilis* y la evolución de las actividades total y específica.

La precipitación con sulfato amónico es una etapa en la que debe ponerse un especial cuidado en reducir al mínimo la destrucción de actividad por exposición a elevada fuerza iónica del medio. Con este fin, la sal añadida era previamente reducida a un fino polvo, el extracto era refrigerado en baño de hielo con agitación suave y se evitaban demoras innecesarias entre cada operación y la siguiente. La mayor parte de la actividad DAAO precipitaba entre el 30 y el 60% de saturación (Figura 22) y este fue el intervalo elegido para purificar/concentrar la DAAO.

La proteína precipitada entre 30 y 60% de saturación con sulfato amónico, redisuelta y desalada se sometía entonces a una secuencia de etapas cromatográficas tras las cuáles la DAAO mostraba pureza electroforética.

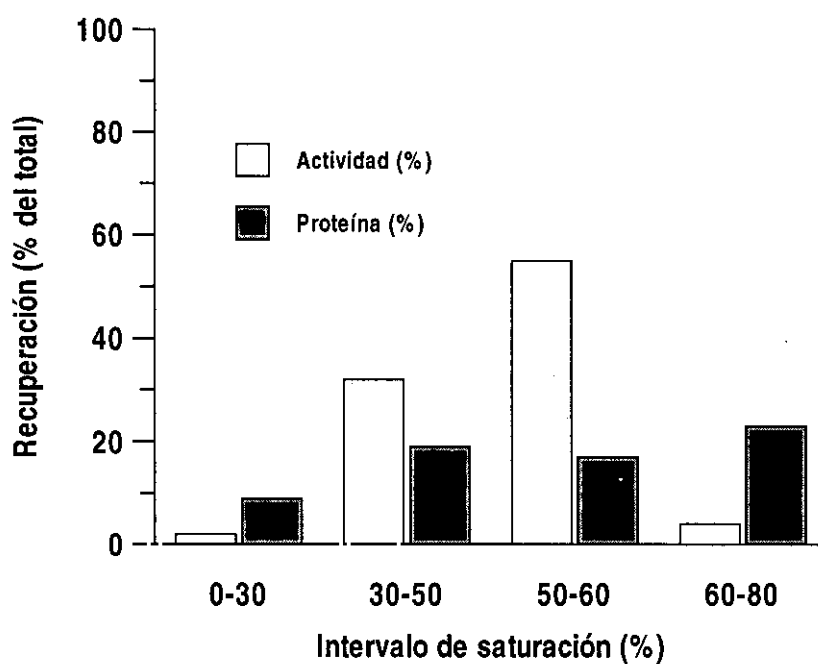


Figura 22. Precipitación con sulfato amónico de la actividad DAAO presente en extractos de *Rhodotorula gracilis*. Los precipitados de los diferentes cortes de saturación redissueltos y dializados para eliminar la sal remanente fueron analizados en cuanto a proteína total y actividad DAAO. Se representan los porcentajes del total en ambos casos.

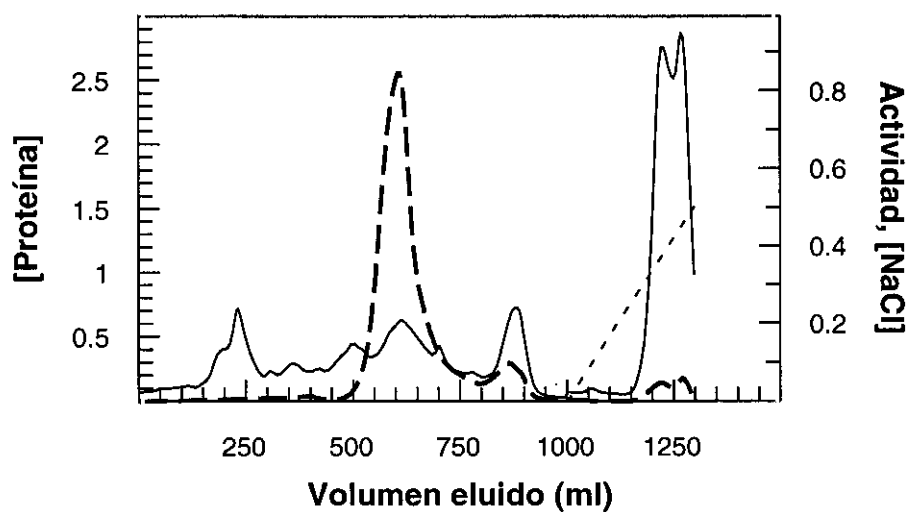


Figura 23. Perfil de elución en DEAE-Sephacel a pH 8.0. Los datos de concentración de proteína (—) corresponden a lecturas de absorbancia a 280 nm y los de actividad (— —) a lecturas de A_{252} tras ensayo de 25 μ l a 30°C con D-fenilglicina. La fuerza iónica (- - -) se representa como concentración de NaCl (M).

En la primera cromatografía en DEAE-Sephacel a pH 8.0 (Figura 23) la actividad eluye isocráticamente si bien se observa una retención parcial. Buena parte de los pigmentos carotenoides que produce *Rhodotorula gracilis* se separan en este paso de la actividad de interés. Es llamativo el hecho de que en esta resina de intercambio aniónico, a pesar del punto isoeléctrico teórico de la enzima de 8.2 (resultante de la suma de las aportaciones de las cadenas laterales presentes en la secuencia) o del valor de 7.9 observado en isoelectroenfoque, sólo se consigue una retención parcial incluso a pH 8.5. La abundancia de residuos hidrofóbicos que contiene la enzima podría explicar esta dificultad de adsorción a resinas de intercambio iónico. El pH elegido fue 8.0 ya que a valores superiores la actividad se repartía entre el intervalo de elución isocrática y el de gradiente salino, resultando un factor de purificación más bajo.

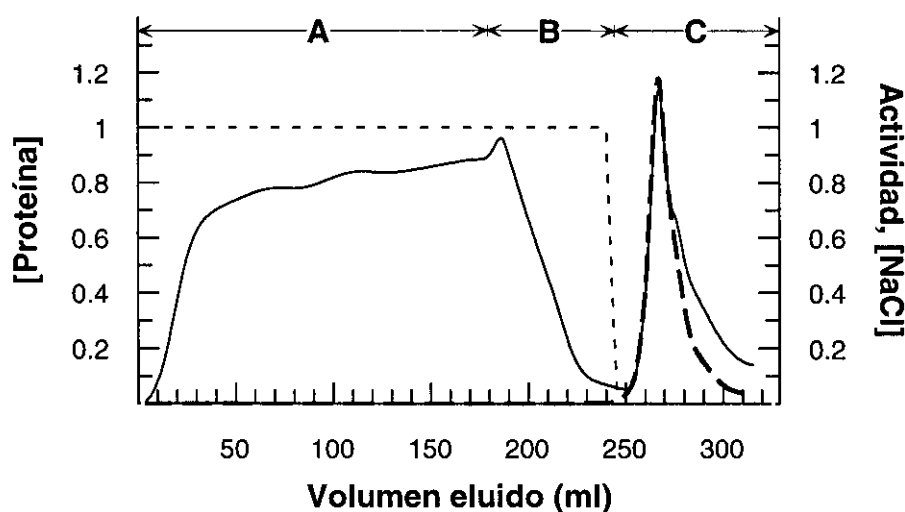


Figura 24. Perfil de elución en Phenyl-Sepharose CL-4B. Los datos de concentración de proteína, actividad y concentración de NaCl se representan como en la Figura 23. En la parte superior se delimitan las tres fases de esta etapa: carga de la preparación enzimática con NaCl hasta 1 M (A), lavado con tampón de equilibrio tras 40 minutos de cierre (B) y elución de la actividad con tampón sin NaCl tras 12 horas de cierre (C).

Las fracciones activas se unían y, previa adición de NaCl hasta 1M, se aplicaban a la columna de Phenyl-Sepharose CL-4B de interacciones hidrofóbicas (Figura 24). La DAAO queda fuertemente retenida como atestigua el color amarillo que tiñe la zona alta de la resina. La mayor parte de las proteínas acompañantes eluyen isocráticamente durante la carga y posterior lavado de la columna. Al hacer pasar tampón sin NaCl y con glicerol al 20% (v/v), la DAAO eluye en un volumen relativamente pequeño.

Finalmente dos etapas de FPLC de intercambio iónico en cartuchos de alta capacidad y flujo rápido (Figura 25) permitían la obtención de DAAO electroforéticamente pura. La primera usa el grupo funcional del S (sulfoetil), un intercambiador más fuerte y de signo contrario al del DEAE a pH 6.5. La segunda, de intercambio aniónico a pH 8.0 usando aminas cuaternarias (Q), consigue no obstante a diferencia del DEAE separar una impureza que en aquel caso se co-purificaba con la DAAO. Es llamativo que en estos dos casos tampoco se retiene la actividad DAAO.

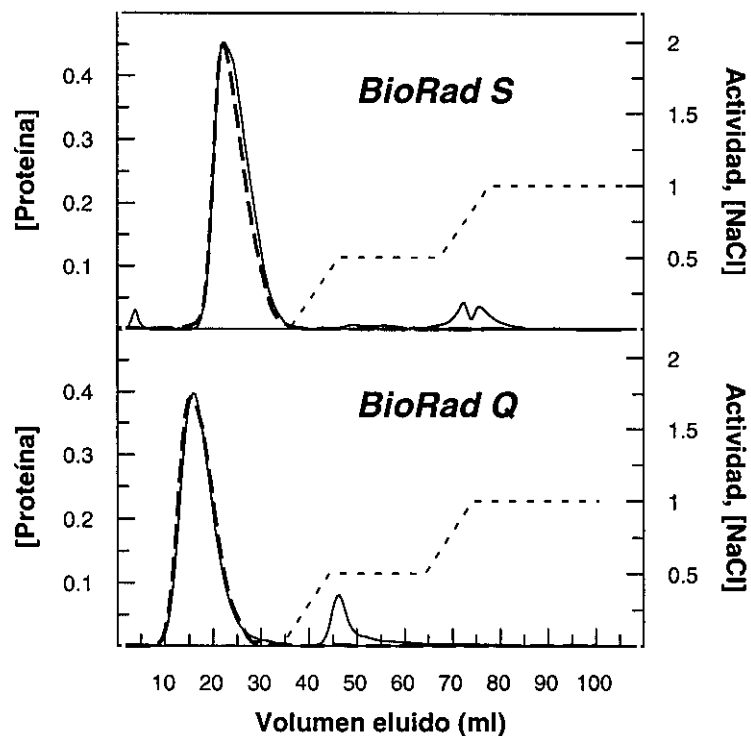


Figura 25. Perfiles de elución en cartuchos Econo-Fast S (pH 6.5) y Q (pH 8.5) de BioRad. Los datos de concentración de proteína, actividad y concentración de NaCl se representan como en la Figura 23.

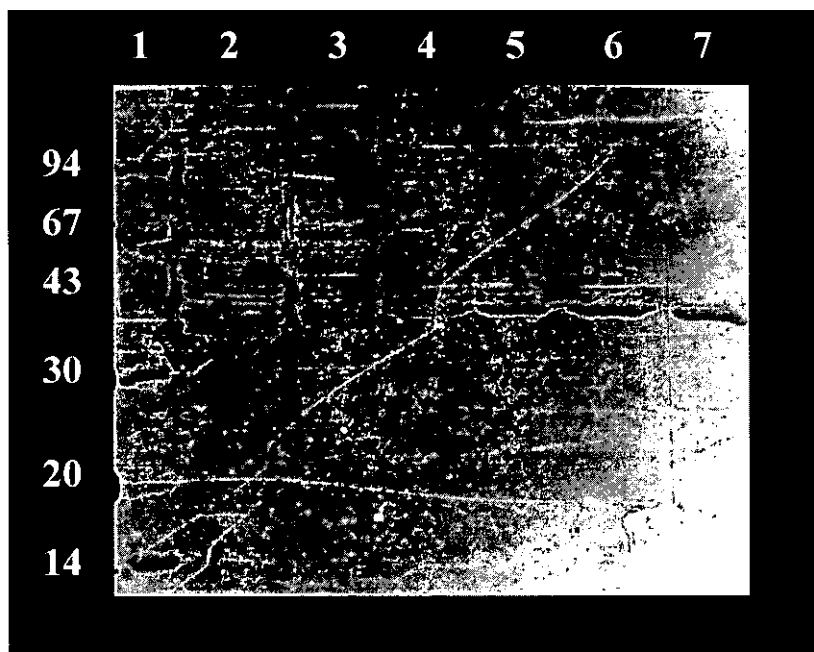


Figura 26. Análisis del proceso de purificación de la DAAO extraída de *Rhodotorula gracilis* por SDS-PAGE. Las muestras (1-10 μ g) se aplicaron a un gel de acrilamida al 12.5% y tras la separación (35 mA) se tiñeron con azul de Coomassie. En las diferentes calles se muestran los patrones de masa molecular conocida (kDa) (1), extracto crudo (2), precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3), eluido de DEAE-Sephacel (4), de Phenyl-Sepharose CL-4B (5), de EconoPac S (6) y de EconoPac Q (7).

Al finalizar el procedimiento de aislamiento, la preparación resultante de DAAO mostraba el espectro típico de flavoproteínas con un cociente A_{274}/A_{455} en torno a 8.5 y mostraba una única banda en geles (SDS-PAGE) teñidos con azul de Coomassie (Figura 26).

Tabla 5. Purificación de DAAO a partir de células de *Rhodotorula gracilis*. Los datos de actividad corresponden a unidades de ($\mu\text{mol(BFA)}/\text{min}$) de actividad frente a D-fenilglicina a pH 8.0 y 30°C. Los datos de la etapa de precipitación con sulfato amónico corresponden a la preparación sometida a desalado en G-25.

Fracción	Proteína Total (mg)	Actividad total (UI)	Actividad Específica (UI/mg)	Recuperación (%total)	Factor de purificación
Extracto Inicial	2351	845	0.36	100.0	1.0
Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	981	624	0.64	73.8	1.8
DEAE-Sephacel a pH 8.0	75	85	1.13	10.1	3.2
Phenyl-Sepharose CL-4B	5.7	66	11.58	7.8	32.2
Cartucho BioRad Mono-S	2.3	44	19.13	5.2	53.2
Cartucho BioRad Mono-Q	1.2	36	30.00	4.3	83.5

1.4.2. Purificación a partir de un clon de *Escherichia coli* que hiperexpresa DAAO

La extracción de DAAO de cultivos de *E.coli* conduce a la obtención de preparaciones en las que una fracción significativa de la enzima se encuentra en forma de apoproteína.

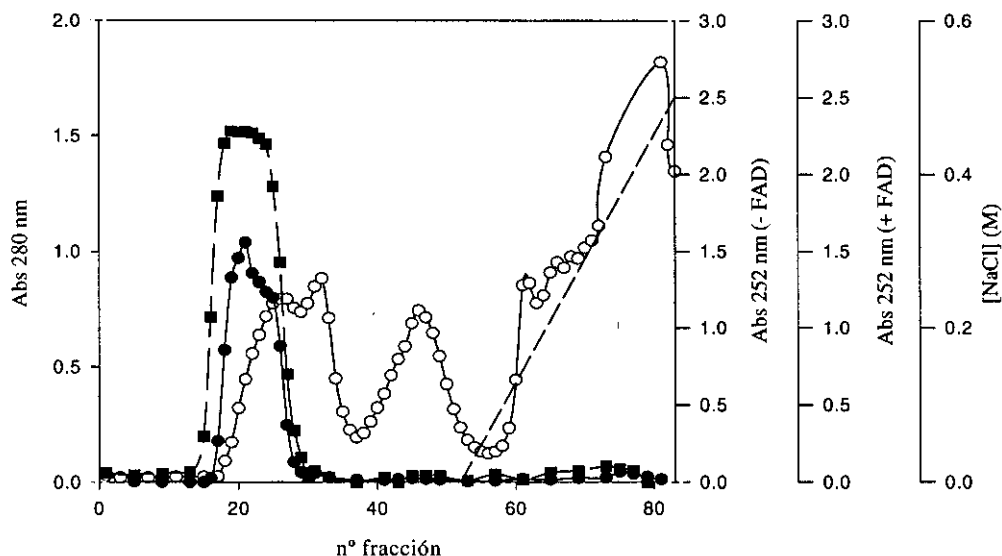


Figura 27. Perfil de elución en DEAE-Sephacel a pH 7.7 de la enzima clonada en *E.coli*. Se muestran la concentración de proteína (A_{280} , —○—), la actividad en ausencia (A_{252} , —●—) y en presencia (A_{252} , —■—) de FAD exógeno, y la concentración de NaCl (— — —).

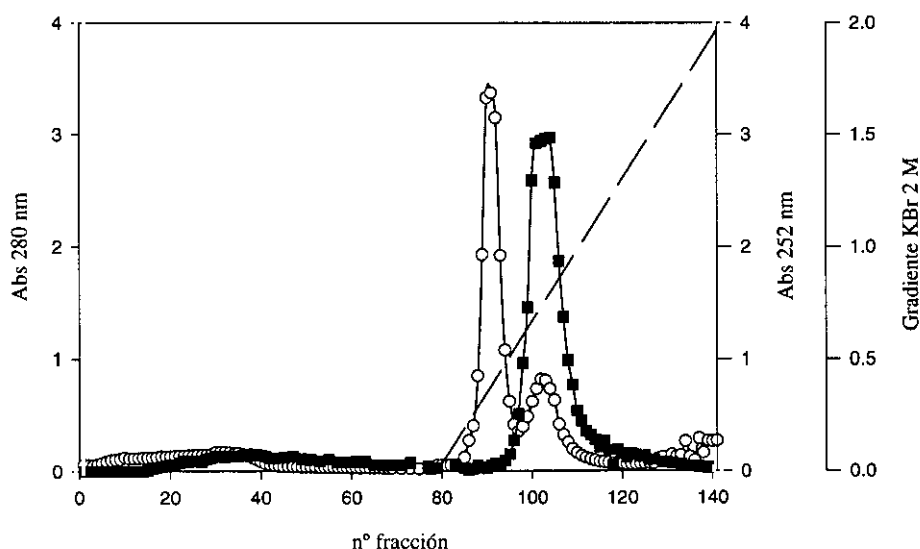


Figura 28. Perfil de elución en Cibacron Blue de la forma apo de la DAAO clonada en *E.coli*. Se muestran la concentración de proteína (A_{280} , —○—), la actividad en presencia de FAD exógeno (A_{252} , —■—), y la concentración de KBr (— — —).

En el primer paso cromatográfico en DEAE-Sephacel a pH 7.7 (Figura 27), la actividad eluyó isocráticamente como se esperaba y el ensayo en ausencia y presencia de FAD exógeno permitió determinar que la apoproteína eluía junto a la holoenzima. Las fracciones con mayor actividad específica unidas se sometían entonces al procedimiento de preparación de apoproteína para su aplicación a la siguiente cromatografía en Cibacron Blue (Figura 28).

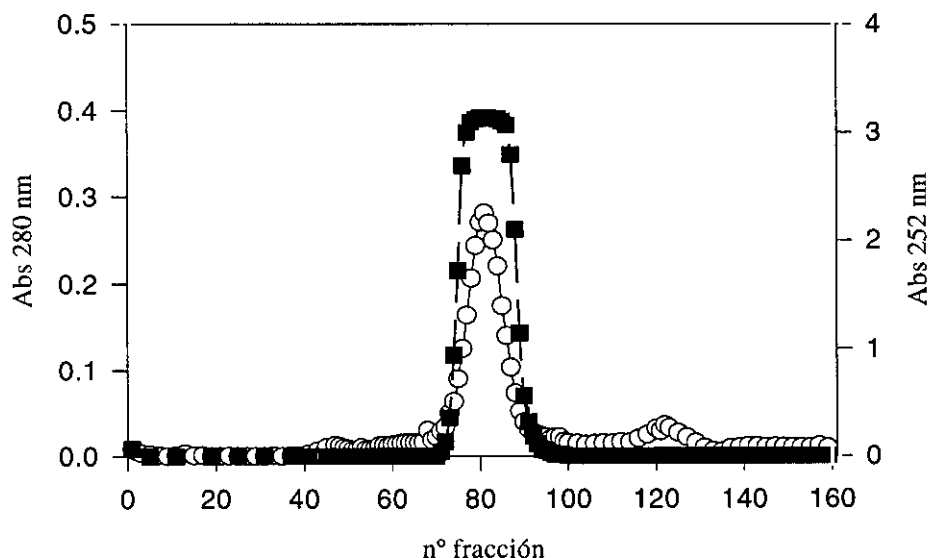


Figura 29. Perfil de elución en Ultugel AcA-44 de la enzima clonada en *E.coli*. Se muestran la concentración de proteína (A_{280} , —○—), y la actividad (A_{252} , —■—).

En este perfil se observa una clara separación de la DAAO respecto a la mayoría de las proteínas acompañantes que se corrobora en el posterior análisis por SDS-PAGE. No obstante, la preparación requiere aún un paso adicional de filtración en gel (Figura 29) que retire las trazas de proteínas de distinto peso molecular que se ven en gel. Después de esta etapa, la preparación exhibía pureza electroforética (Figura 30) y un cociente A_{274}/A_{455} de 8. La Tabla 6 muestra la evolución de la recuperación y la eficacia en cada etapa.

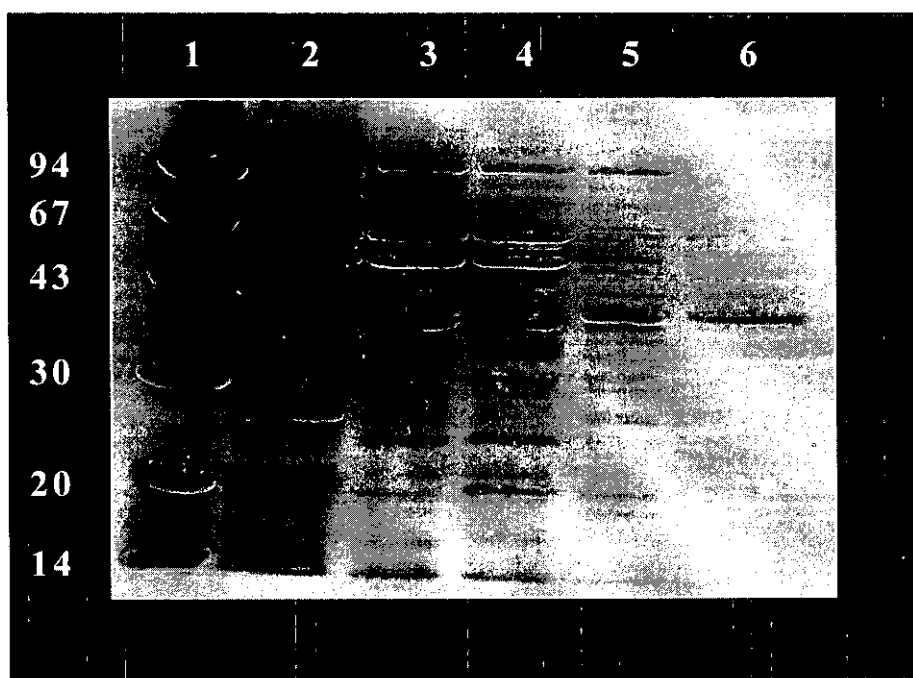


Figura 30. SDS-PAGE del proceso de purificación de DAAO a partir del clon de *E.coli*. Los números del margen izquierdo representan los pesos moleculares en kDa de los marcadores de peso molecular (calle 1) y los del margen superior las calles: extracto crudo (2), eluido de DEAE-Sephacel antes (3) y después (4) de diálisis frente a KBr, eluido de Cibacron Blue (5) y eluido de Ultrogel AcA-44.

Tabla 6. Recuperación y purificación tras cada etapa en el proceso de purificación de la DAAO clonada en células de *Escherichia coli*. Los datos de actividad corresponden a unidades de ($\mu\text{mol(BFA)}/\text{min}$) de actividad frente a D-fenilglicina a pH 8.0 y 30°C.

ETAPA	Proteína (mg)	Actividad (UA)	A.E. (UA/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación	Porcentaje de apoproteína
Extracto celular	333	(-FAD) 292 (+FAD) 446	1.34	100	1	35
DEAE Sephacel	124	(-FAD) 265 (+FAD) 418	3.37	94	2.5	37
Cibacron Blue	3.8	(-FAD) --- (+FAD) 22	5.89	5	4.4	100
Ultrogel AcA 44	1.84	(-FAD) --- (+FAD) 15	16.6	3.5	12.4	100

2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

2.1. Determinación de la masa molecular

La masa molecular de la DAAO de *Rhodotorula gracilis* fue determinada experimentalmente de dos formas: por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y por cromatografía de penetrabilidad en Ultrogel AcA-44 (Figura 31). En el primer caso se obtuvo un valor de 37.5 kDa correspondiente al monómero, mientras que en el segundo se observó una masa molecular aparente de 80.3 kDa que corresponde a la forma activa fundamental de la enzima que es el dímero.

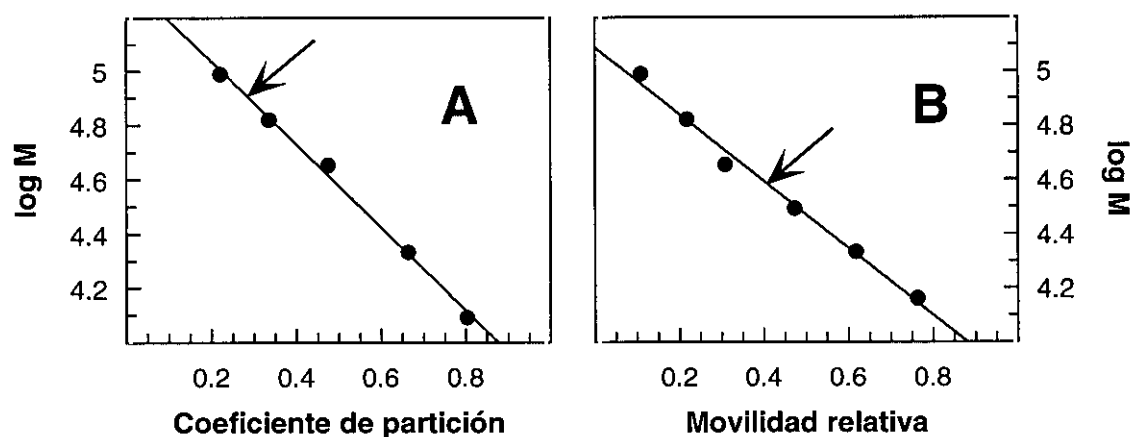


Figura 31. Determinación de la masa molecular de DAAO. (A), por cromatografía de penetrabilidad en Ultrogel AcA-44. (B), por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Las flechas indican la posición de la DAAO en cada caso.

2.2. Determinación del punto isoelectrico

El punto isoelectrico de la proteína obtenido por isoelectroenfoque fue de 7.9, en contraste con los valores publicados de 7.3 y 7.5 para las dos isoformas de la enzima descritas (Curti y col., 1992). El valor experimental se aproxima sin embargo al obtenido tras simulación por ordenador de la curva de titulación de la apoproteína (8.2) (Figura 32).

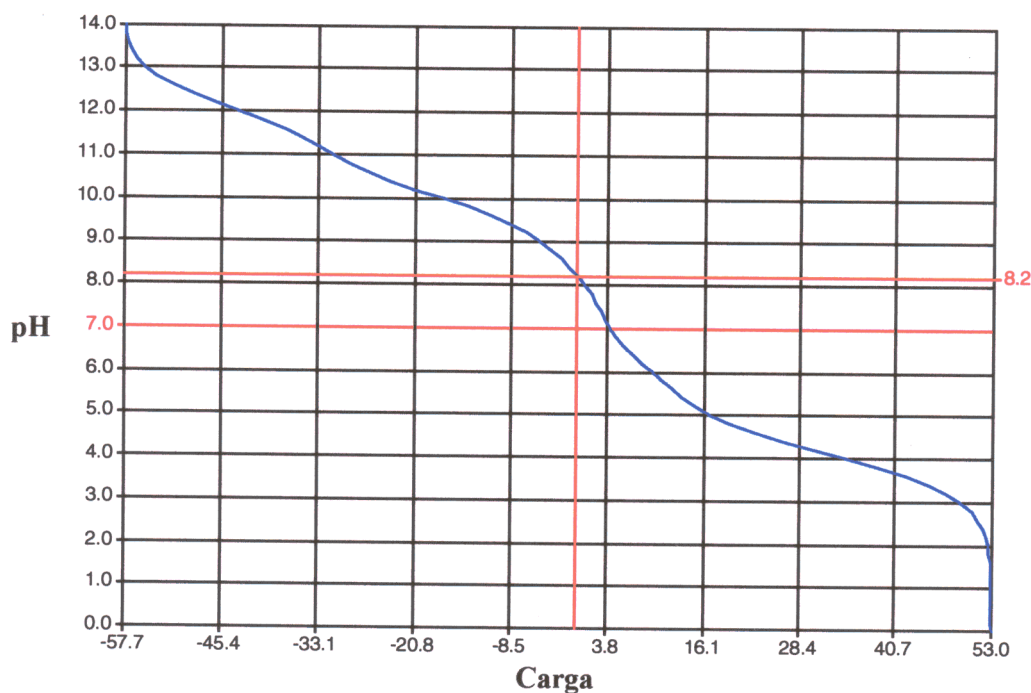


Figura 32. Curva teórica de titulación de la apo-DAAO de *Rhodotorula gracilis*. Simulación por ordenador basada en la composición de aminoácidos y llevada a cabo con el programa ProteAn (DNASStar Inc., EEUU)

2.3. Análisis de aminoácidos

Tras la identificación de los picos detectados por el analizador de aminoácidos y la tabulación de sus áreas se llevó a cabo el procesamiento de los datos para obtener los nanomoles de cada aminoácido por nanomol de DAAO. La Tabla 7 muestra los resultados del análisis en comparación con los publicados anteriormente (Pilone Simonetta y col., 1989) y con la secuencia real basada en la secuencia del gen publicada con posterioridad (Faotto y col., 1995).

Tabla 7. Composición aminoacídica cuantitativa de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*

Aminoácido	Por análisis de aminoácidos		Traducción del gen (1995)
	A (1993)	B (1989)	
Ala	33	33	35
Cys	6	6	6
Asx	25	27	25
Glx	34	34	35
Phe	9	9	8
Gly	38	34	35
His	10	9	9
Ile	15	13	16
Lys	18	18	17
Leu	33	32	33
Met	4	4	4
Pro	21	22	23
Arg	28	22	26
Ser	28	26	28
Thr	22	23	22
Val	26	22	27
Trp	—	9	8
Tyr	11	10	11

A : según análisis de aminoácidos del presente trabajo experimental

B : según análisis de aminoácidos publicado por Simoneta y cols. (1989)

2.4. Estudios espectroscópicos

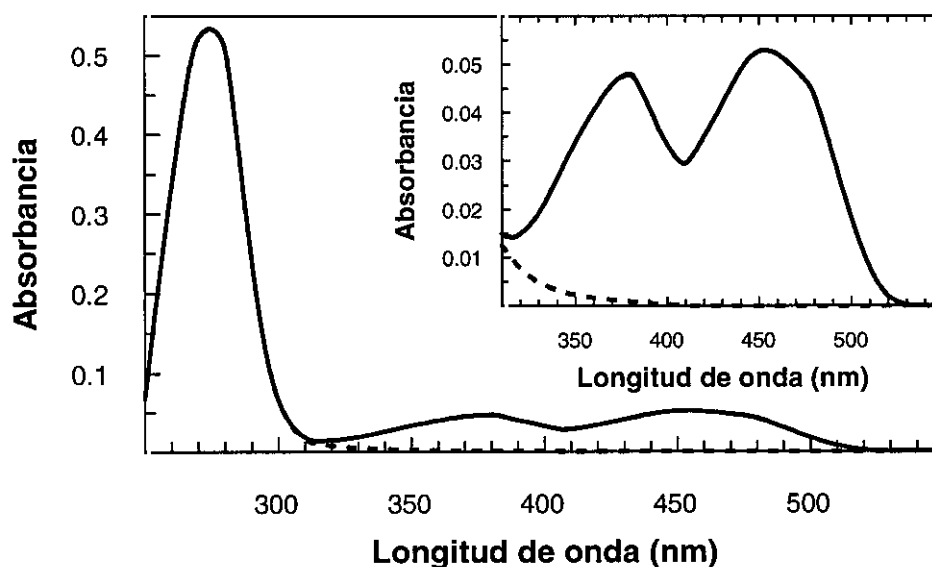


Figura 33. Espectro de absorción UV/Vis de las formas apo y holo de DAAO. La absorción de luz se registró en el intervalo 250-550 nm a una velocidad de 600 nm/min en muestras de holoenzima (—) y de apoproteína (- - -). La representación interior muestra un detalle de la región visible del espectro.

Los espectros de absorción de luz de las formas apo y holo de la DAAO (Figura 33) difieren significativamente en la región visible como cabe esperar por la aportación determinante de la flavina en esta zona del espectro. La enzima clonada exhibía las mismas características espectroscópicas que la extraída de la levadura.

El espectro de emisión de fluorescencia de una proteína puede dar información del microentorno de determinados residuos (fundamentalmente triptófanos). Los espectros de emisión correspondientes a la apoproteína (a) y holoenzima (b) excitadas con luz monocromática a 280 nm, se muestran en la Figura 34.

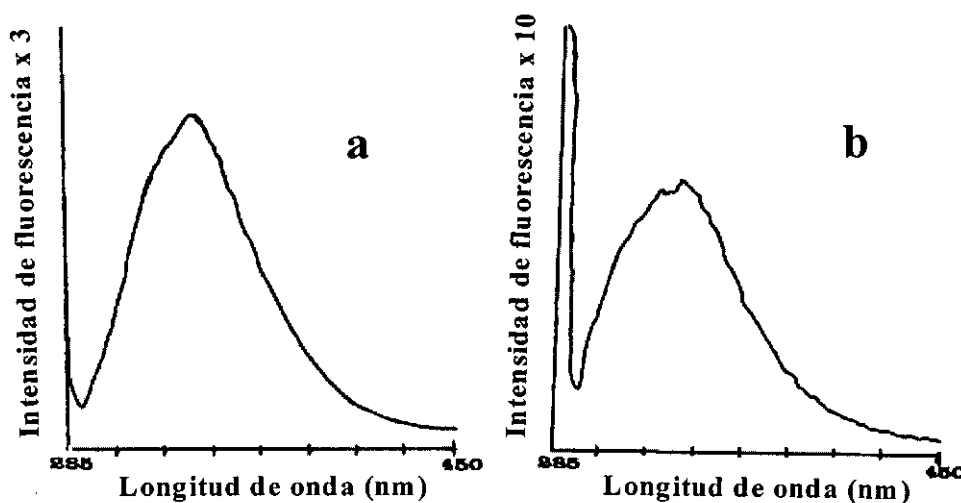


Figura 34. Espectros de emisión de fluorescencia de las formas apo (a) y holo (b) de la DAAO. El haz de excitación tenía una longitud de onda de 280 nm. Las rendijas de excitación y emisión se ajustaron a 5 mm. El factor de amplificación fue 3 para la apoproteína y 10 para la holoenzima.

La luz de 280 nm excita a triptófanos y tirosinas, si bien la contribución de estas últimas al espectro de emisión de proteínas estructuradas es pequeña (Lakowicz, 1998). De ahí que el espectro de emisión de la DAAO, que tiene 10 tirosinas y 8 triptófanos, sea el característico del triptófano, con un máximo a 335 nm. De la inspección de los espectros obtenidos se desprenden cambios llamativos en la transición de apoproteína a holoenzima. Acompañan a este proceso una fuerte disminución de la intensidad de fluorescencia, así como la aparición de otro máximo a longitudes de onda menores (325 nm), lo que puede interpretarse como la consecuencia del cambio en el microentorno de uno o varios triptófanos hacia un entorno más apolar. No sorprende un cambio tan significativo si se tiene en cuenta que durante el ensamblaje de la holoenzima ocurren importantes cambios conformacionales y de microentorno provocados por la unión del FAD y la dimerización.

El espectro de dicroísmo circular de la DAAO de *Rhodotorula gracilis* se muestra en la Figura 35.

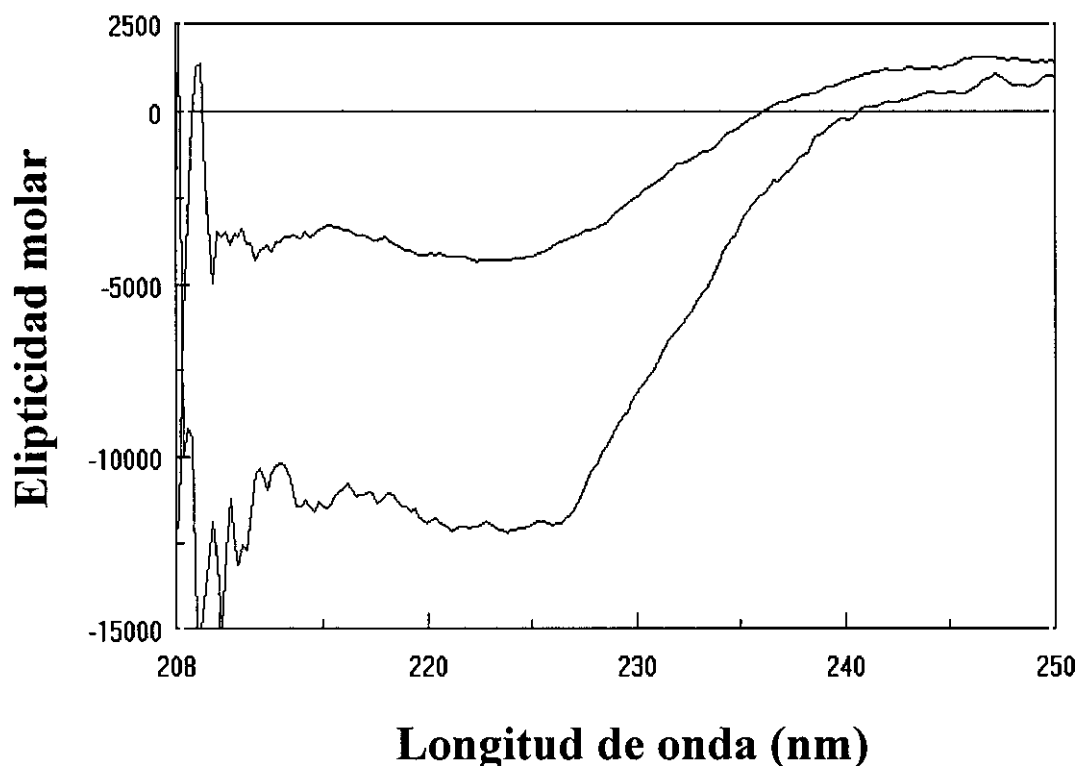


Figura 35. Espectros de dicroísmo circular de las formas apo y holo de la DAAO. La traza superior corresponde a la holoenzima y la inferior a la apoproteína.

De la inspección y análisis de dicho espectro se deduce la presencia de un 25% de estructura secundaria en hélice α para la apoproteína y un 15% para la holoenzima. En ambos casos, el aparato registró mucho ruido por debajo de 210 nm, por lo que la información sobre estructura en lámina β no fue accesible. La marcada diferencia entre estos dos espectros puede responder a los cambios conformacionales a los que se ha hecho referencia al analizar los espectros de emisión de fluorescencia.

2.5. Análisis de la secuencia de aminoácidos

El análisis de la composición de aminoácidos de la DAAO de *Rhodotorula gracilis* según la secuencia se muestra en la Tabla 8.

La elevada proporción de residuos hidrofóbicos y la predominancia de residuos básicos confieren a esta proteína buena parte de las propiedades físico-químicas que fundamentan su comportamiento durante la purificación como la dificultad de adsorción a resinas de intercambio iónico en general y catiónico en particular, su fuerte retención en columnas de interacciones hidrofóbicas y la proporcionalidad entre la concentración y la estabilidad. La cantidad relativamente alta de triptófanos, tirosinas y fenilalaninas explica su fuerte absorción de luz en el ultravioleta cercano ($A_{1\text{ cm}}^{0.1\%}(274)=2.78$).

Tabla 8. Composición aminoacídica de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*.

Aminoácidos		Número	% por peso	% por número
Cargados	(RKHYCDE)	109	36.90	29.62
Ácidos	(DE)	40	12.22	10.87
Básicos	(KR)	43	15.57	11.68
Polares	(NCQSTY)	87	23.84	23.64
Hidrofóbicos	(AILFWV)	127	33.38	34.51
Ala	A	35	6.21	9.51
Cys	C	6	1.54	1.63
Asp	D	19	5.46	5.16
Glu	E	21	6.76	5.71
Phe	F	8	2.94	2.17
Gly	G	35	4.99	9.51
His	H	9	3.08	2.45
Ile	I	16	4.52	4.35
Lys	K	17	5.44	4.62
Leu	L	33	9.32	8.97
Met	M	4	1.31	1.09
Asn	N	6	1.71	1.63
Pro	P	23	5.57	6.25
Gln	Q	14	4.47	3.80
Arg	R	26	10.13	7.07
Ser	S	28	6.08	7.6
Thr	T	22	5.55	5.98
Val	V	27	6.68	7.34
Trp	W	8	3.72	2.17
Tyr	Y	11	4.48	2.99

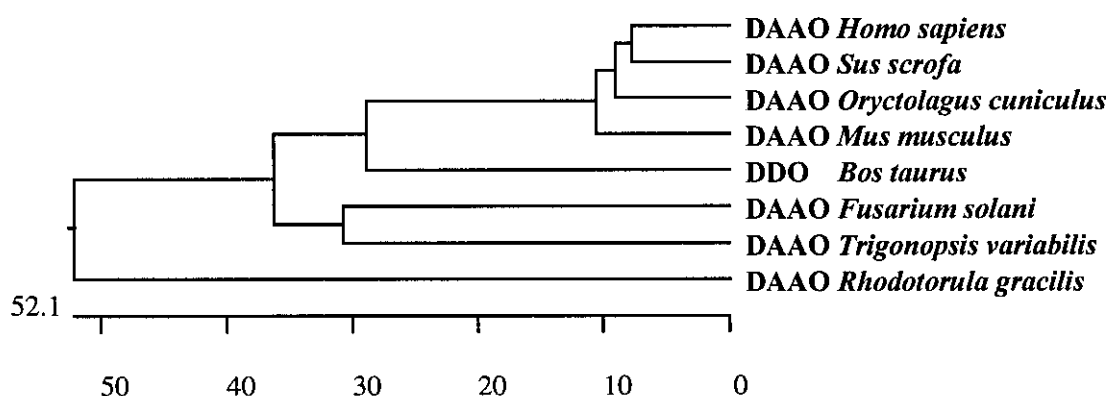


Figura 36. Árbol filogenético de las 8 oxidasas cuyas secuencias se han comparado. Todas son D-aminoácido oxidasas (DAAO), excepto la de *Bos taurus*, que es una D-aspartato oxidasa (DDO). Las distancias filogenéticas se indican en el eje inferior

En el apéndice se muestran las representaciones de la estructura primaria en modos de fórmula química (Figura A1) y de relleno especial (Figura A2), así como los perfiles de predicción de estructura secundaria según los diferentes métodos de análisis (Figura A3), el alineamiento de la secuencia de la DAAO de *Rhodotorula gracilis* con las de otras oxidasas (Figura A4) y el modelo tridimensional de un fragmento de la DAAO de *Rhodotorula gracilis* basado en la estructura conocida de la enzima de riñón de cerdo (Figura A5). Los únicos residuos para los que se ha descrito un papel esencial en la DAAO de riñón de cerdo y para los que se obtiene identidad en el alineamiento con la DAAO de *Rhodotorula gracilis* (Fig.A1, en color rojo) son Tyr²²³, Arg²⁸⁵ e His³²⁹ (Tyr²²⁴, Arg²⁸³ e His³⁰⁷ en la enzima de cerdo). La Figura 36 muestra el árbol filogenético con las distancias filogenéticas. Las enzimas fúngicas aparecen claramente separadas de las de mamífero y la de *Rhodotorula gracilis* se distancia adicionalmente de las de *Trigonopsis variabilis* y *Fusarium solani*.

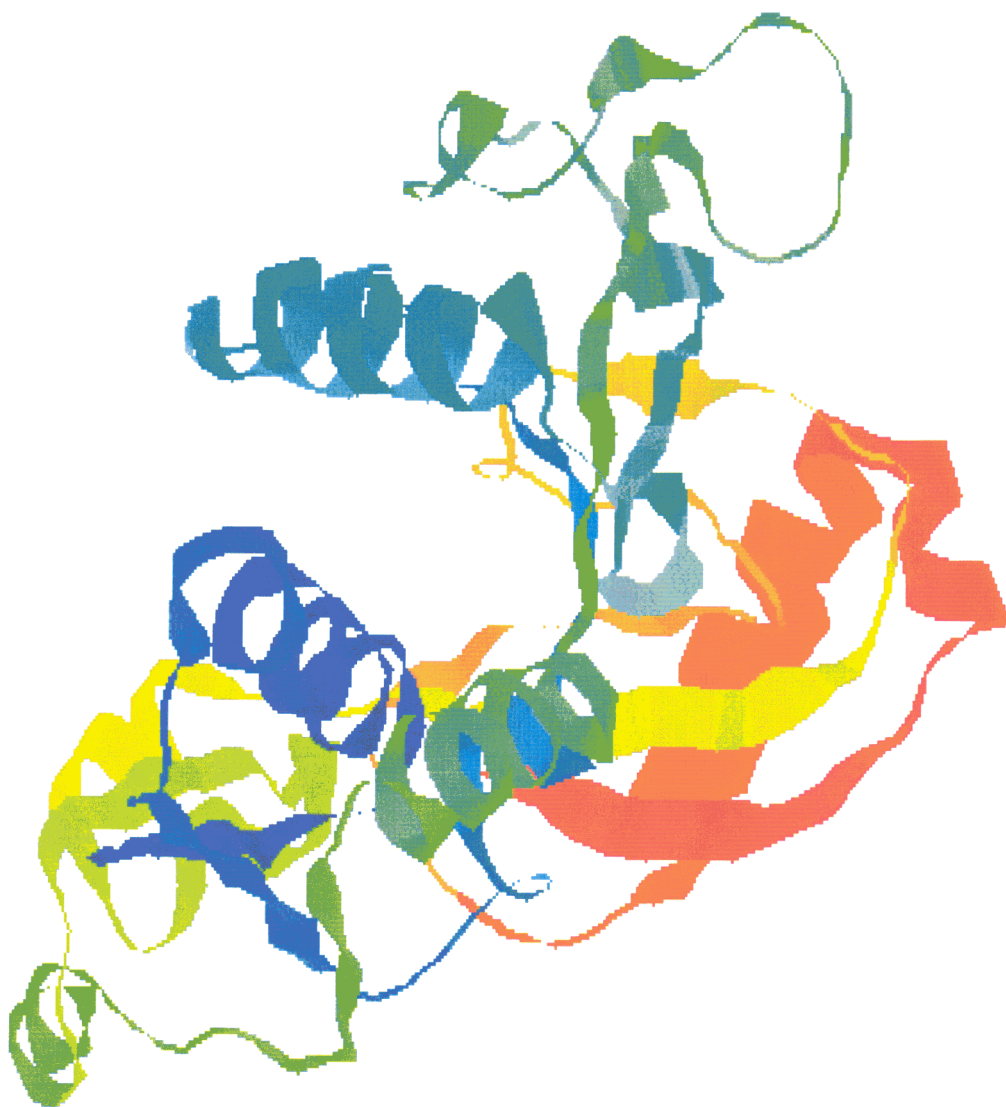


Figura 37. Modelo tridimensional parcial de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*. Usando los datos cristalográficos de la enzima de riñón de cerdo, el programa SwissModel construyó este modelo truncado (Lys⁵-Ile²⁷⁵) en el que se representa en forma de cinta la estructura del esqueleto coloreada con un gradiente de azul (NH-terminal) hasta rojo (COOH-terminal).

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de estas 8 oxidasas se muestra en la Figura A4 del Apéndice. En ella se observa la conservación de una serie de residuos en todas las enzimas comparada. Entre ellos y, usando la numeración de la secuencia de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*, Asp⁴⁰, Trp¹⁰⁷, Tyr¹⁴², Asn¹⁷⁷, Asp¹⁹¹, Pro¹⁹⁶, Arg¹⁹⁸, Gln²⁰⁰, Tyr²²³, Trp²⁴³, Pro²⁶⁴, Arg²⁸⁵, Pro²⁸⁶, Arg²⁸⁸, His³²⁹ y Tyr³³¹.

El modelo tridimensional parcial obtenido por analogía con la enzima de riñón de cerdo, cuya estructura tridimensional ha sido resuelta por difracción de rayos X, se muestra en la Figura 37. En la vista representada puede observarse el 'bolsillo' de acomodación del FAD.

3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

3.1. Estudios de la unión del FAD

La constante de disociación del FAD de la apoproteína fue calculada tanto para la enzima aislada de *Rhodotorula gracilis* como para la clonada en *E.coli*.

La Figura 38 muestra la curva de titulación de sitios de unión de FAD presentes en una preparación de apoproteína por seguimiento de la fluorescencia flavínica. Como se esperaba, se obtienen dos tramos de relación lineal separados por una región de inflexión. La abscisa del punto de intersección de las dos rectas que representan las pendientes inicial y final es 47.95 μl de FAD 10 μM , que corresponde a una concentración de 240 nM. Este valor es muy cercano a 247 nM, que es la concentración de apoproteína presente en la cubeta según titulación previa de sitios de unión por actividad enzimática.

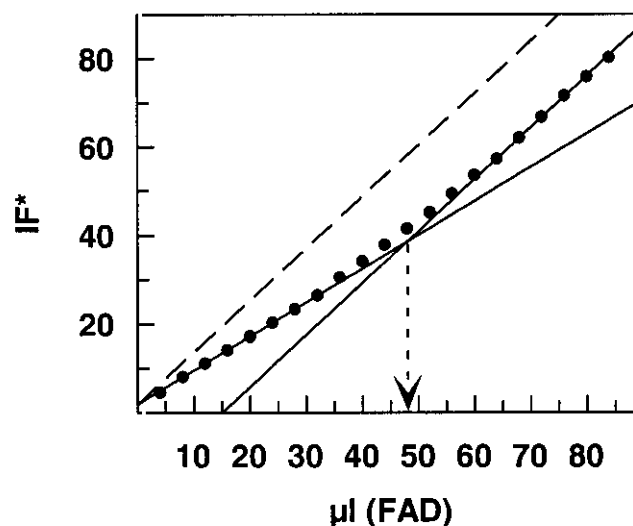


Figura 38. Curva de titulación de apoproteína por seguimiento de la fluorescencia flavínica. La intensidad de fluorescencia flavínica corregida para la dilución (IF^*) tras la adición de sucesivas cantidades de FAD 10 μM se representa frente al volumen de FAD añadido. Las dos líneas continuas representan las pendientes inicial y final, la discontinua corresponde a la pendiente que se obtendría si las adiciones se realizaran sobre tampón y la de puntos señala la cantidad de FAD que corresponde a la concentración de sitios de unión presentes en la preparación de apoproteína.

Los puntos comprendidos en la zona curva que conecta las dos regiones de relación lineal se usaron entonces para calcular las fracciones de saturación que permiten la aproximación gráfica al valor de la constante de disociación (K_D). La Figura 39 muestra la representación de cuya pendiente se deduce el valor de esta constante. El valor de K_D deducido de esta representación es $0.90 \cdot 10^{-8}$ M. El intercepto en el eje de abscisas debe corresponder a la concentración total de apoproteína y, de hecho, el valor obtenido (256 nM) es muy cercano al determinado experimentalmente (247 nM).

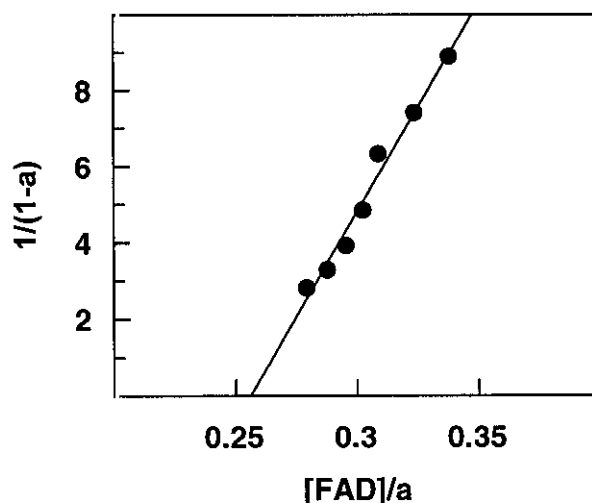


Figura 39. Determinación gráfica de K_D . Los valores de saturación fraccional (a) se representan de forma que la pendiente equivale a la inversa de la constante de disociación.

El mismo procedimiento experimental se siguió para determinar la constante de disociación del FAD para la proteína clonada en *E.coli*. El valor obtenido ($0.92 \cdot 10^{-8}$) está en estrecha correspondencia con el encontrado para la proteína purificada directamente de *Rhodotorula gracilis*.

3.2. Especificidad de sustrato

De los sustratos cuya reacción con la DAAO ha sido caracterizada en el presente trabajo experimental (Tabla 9), el mejor ha sido el de mayor interés industrial, la cefalosporina C. La D-alanina tiene una K_M similar pero la eficacia catalítica de la DAAO frente a este sustrato es algo menor. La DAAO muestra similar afinidad por D-fenilglicina y D-serina aunque oxida más rápidamente la primera.

Tabla 9. Parámetros cinéticos para algunos sustratos de la DAAO.

SUSTRATO	K_M (mM)	$V_{MÁX}$ ($\mu\text{mol/min}$)
D-fenilglicocola	5,06	0,140
D-alanina	0,97	0,100
Cefalosporina C	1,03	0,174
D-serina	3,98	0,035

3.3. Estabilidad frente a pH y temperatura

Con el fin de asegurar que las disminuciones de actividad observadas en los estudios de pH reflejen únicamente ionizaciones reversibles de la enzima y no alteraciones irreversibles, antes de establecer los intervalos de pH y temperatura a usar en los estudios de pH, se determinaron los intervalos en los que la enzima mantiene su actividad sin observarse una desnaturalización significativa.

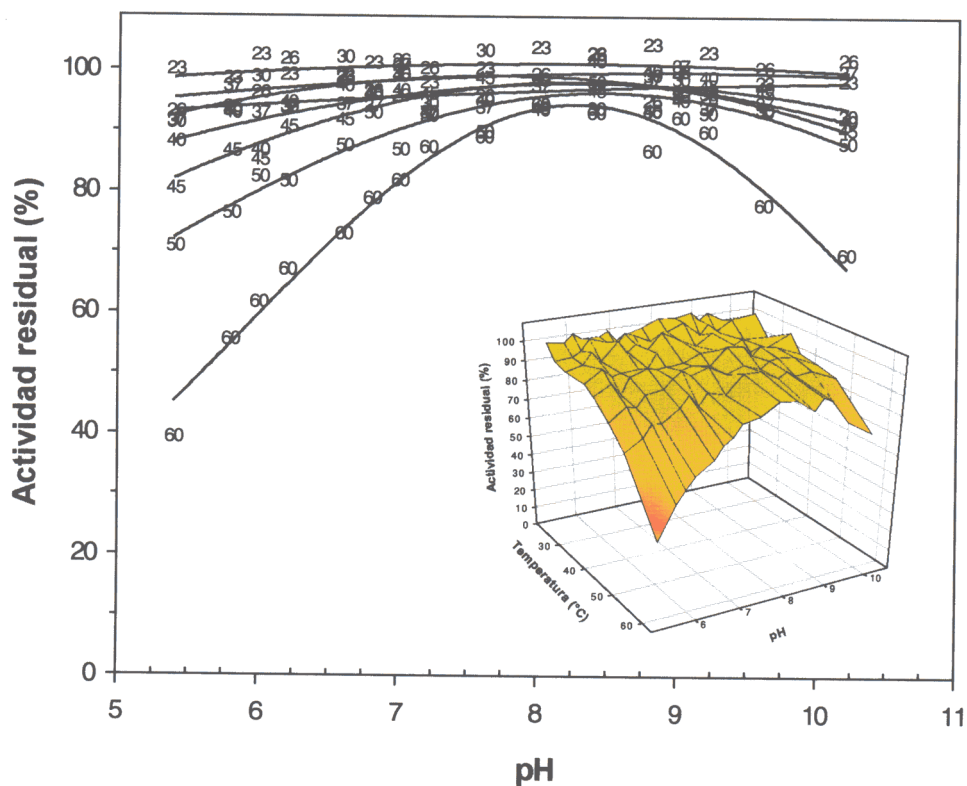


Figura 40. Estabilidad frente a pH y temperatura. Alícuotas de 3 μ l (4.67 μ M) de DAAO en tampón fosfato potásico 5 mM a pH 8.0 fueron incubadas durante 10 minutos con 47 μ l del sistema de tampones fosfato/pirofosfato 20/20 mM a diferentes pH's y a diferentes temperaturas (23; 26; 30; 37; 40; 45; 50 y 60 °C) y a continuación fueron enfriadas en baño de hielo. De cada mezcla se ensayaron duplicados de 10 μ l con D-alanina 10 mM en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 8.5 en un volumen final de 100 μ l durante 10 minutos a 30°C. El recuadro interior representa los datos experimentales en forma de superficie tridimensional.

La enzima no mostró pérdidas significativas de actividad en 10 minutos a temperaturas por debajo de 45°C en el intervalo de pH 5.4-10.2. A 50°C se observa inactivación a pH's bajos (30% a pH 5.4) y a 60°C los dos extremos del intervalo de pH producen pérdidas significativas de actividad (60% a pH 5.4 y 30% a pH 10.2). Por estas razones se seleccionaron los intervalos 20°C-45°C y 5.5-10.5 para la temperatura y el pH respectivamente en los estudios de pH de esta enzima.

4. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL H_2O_2 SOBRE LA DAAO

Los estudios de la inhibición ejercida por el H_2O_2 como producto de la reacción catalizada por la DAAO así como de la inactivación observada tras oxidación por este agente oxidante pueden proporcionar valiosa información sobre el mecanismo de dicha reacción y sobre la función de los residuos susceptibles de oxidación y responsables de la pérdida de actividad.

4.1. Estudios de inhibición por producto

Recientemente se ha elucidado el mecanismo cinético de la DAAO de *Rhodotorula gracilis* (Pollegioni y col., 1993), el cuál implica un complejo ternario siendo la semireacción reductiva el paso limitante de velocidad. Para determinar el orden de liberación de productos, se llevaron a cabo estudios de inhibición por producto. La Figura 41 muestra las representaciones dobles recíprocas de $1/v$ frente a $1/S$ a varias concentraciones de ácido pirúvico. El ácido pirúvico inhibió competitivamente la reacción siendo la D-alanina el sustrato variable, lo que indica que ambos compuestos se combinan con la misma forma de la enzima (E); la representación secundaria de las pendientes (Figura 41, recuadro interno) fue lineal indicando una inhibición competitiva con una K_i de 1.81 mM.

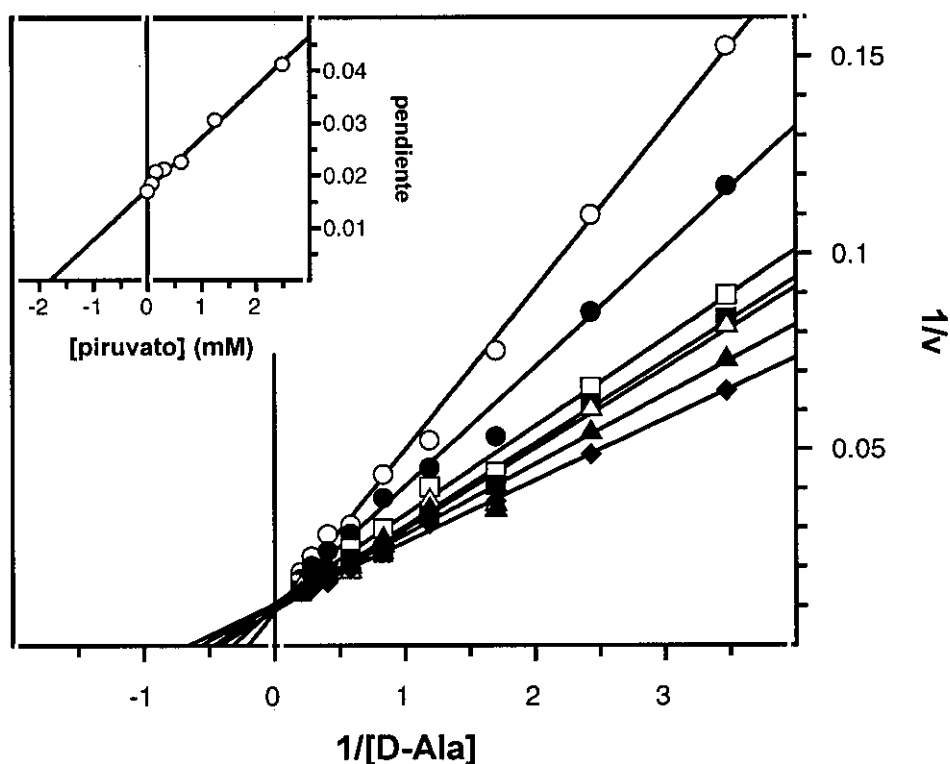


Figura 41. Representaciones dobles recíprocas de inhibición por producto (ácido pirúvico). Las condiciones experimentales como se describe en la pág.47. La actividad enzimática fue medida usando el sistema acoplado de peroxidasa en mezclas de ensayo con inhibidor 0.5-10 mM. **Recuadro interno:** Representación secundaria de pendientes frente a la concentración de ácido pirúvico.

El H_2O_2 fue un inhibidor no competitivo cuando la D-alanina se usó como sustrato variable y el O_2 no llegaba al nivel de saturación, lo que indica que el H_2O_2 se une a una forma de enzima diferente a la que une D-alanina. La inhibición fue no competitiva pura (Figura 42); la familia de representaciones recíprocas se intersectan en el eje $1/[\text{S}]$; las pendientes y los interceptos sobre el eje $1/v$ mostraron un comportamiento lineal (Figura 42, recuadro interno). Las constantes de inhibición correspondientes fueron: $K_{is} = 0.52 \text{ mM}$ y $K_{ii} = 0.70 \text{ mM}$.

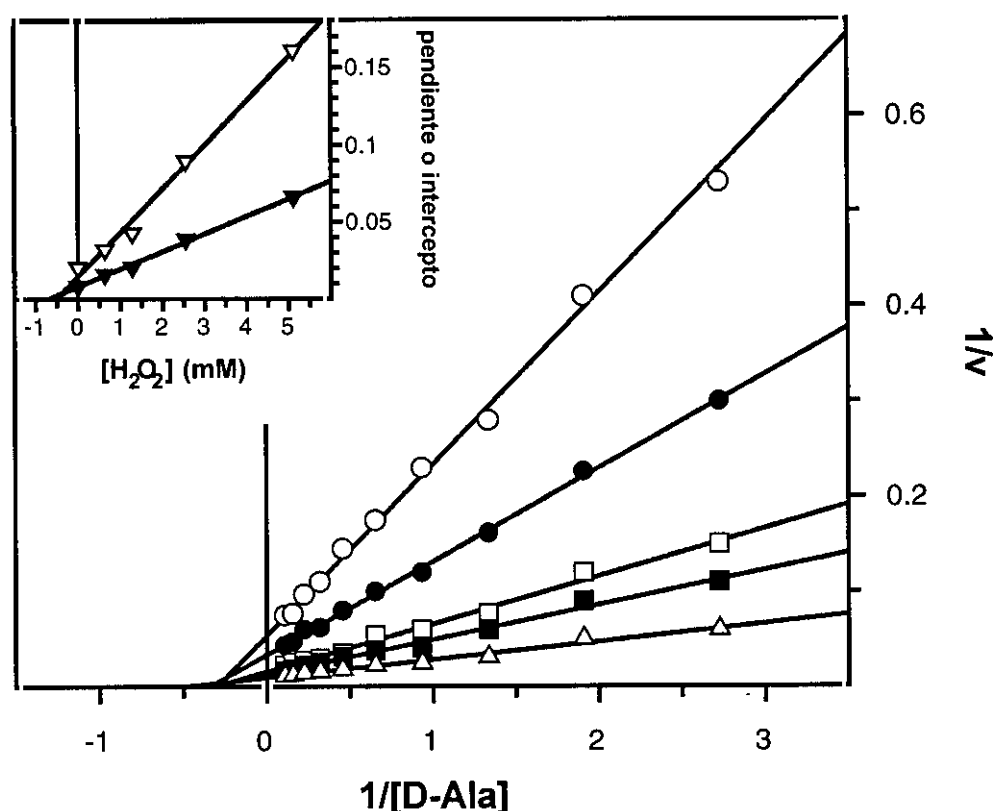


Figura 42. Representaciones dobles recíprocas de inhibición por producto (H_2O_2). Condiciones experimentales como en la Figura 41. Ensayo estándar de actividad residual. **Recuadro interno:** Representación secundaria de pendientes (∇) e interceptos (\blacktriangledown) frente a la concentración de H_2O_2 .

Estos resultados indican que el H_2O_2 es el primer producto en liberarse y el ácido pirúvico el segundo (Cleland, 1977) en concordancia con la hipótesis de Pollegioni y col. (1993).

4.2. Modificación química

También se estudió el efecto del H_2O_2 como modificador químico de la DAAO. Se caracterizó la cinética de esta oxidación y se identificó el tipo de residuos que se oxidan como se describe a continuación.

4.2.1. Cinética de inactivación

Para analizar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la D-aminoácido oxidasa, holo- y apoenzima fueron preincubadas con peróxido de hidrógeno 1-50 mM a los tiempos indicados.

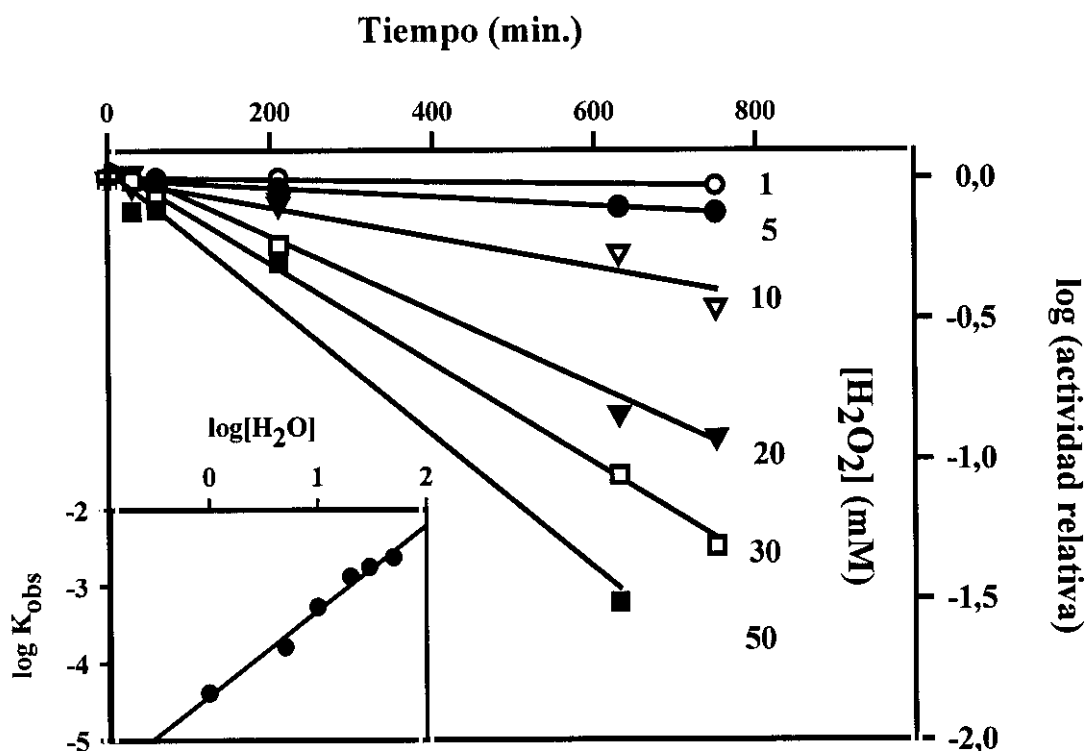


Figura 43. Inactivación con el tiempo de la holo-D-aminoácido oxidasa. Soluciones de DAAO 0.7 μ M fueron preincubadas con H_2O_2 en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 8 y 30°C. La actividad enzimática residual fue medida en presencia de D-alanina 10 mM como sustrato. La solución de sustrato contenía catalasa 0.2 mg/ml para retirar el H_2O_2 . **Recuadro interno:** logaritmo de la constante aparente de inactivación de primer orden (K_{obs}) frente al logaritmo de la concentración de H_2O_2 .

La Figura 43 muestra el progreso de la inactivación de la holoenzima en presencia de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. La inactivación siguió una cinética de pseudoprimer orden con una constante de velocidad de segundo orden de $6.96 \cdot 10^{-5} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (del intercepto de la representación secundaria en la Figura 43). Puede observarse que la holoenzima es bastante resistente al efecto perjudicial del peróxido de hidrógeno ya que la actividad permaneció inalterada después de 13 horas de preincubación de la enzima con peróxido de hidrógeno 1-5 mM.

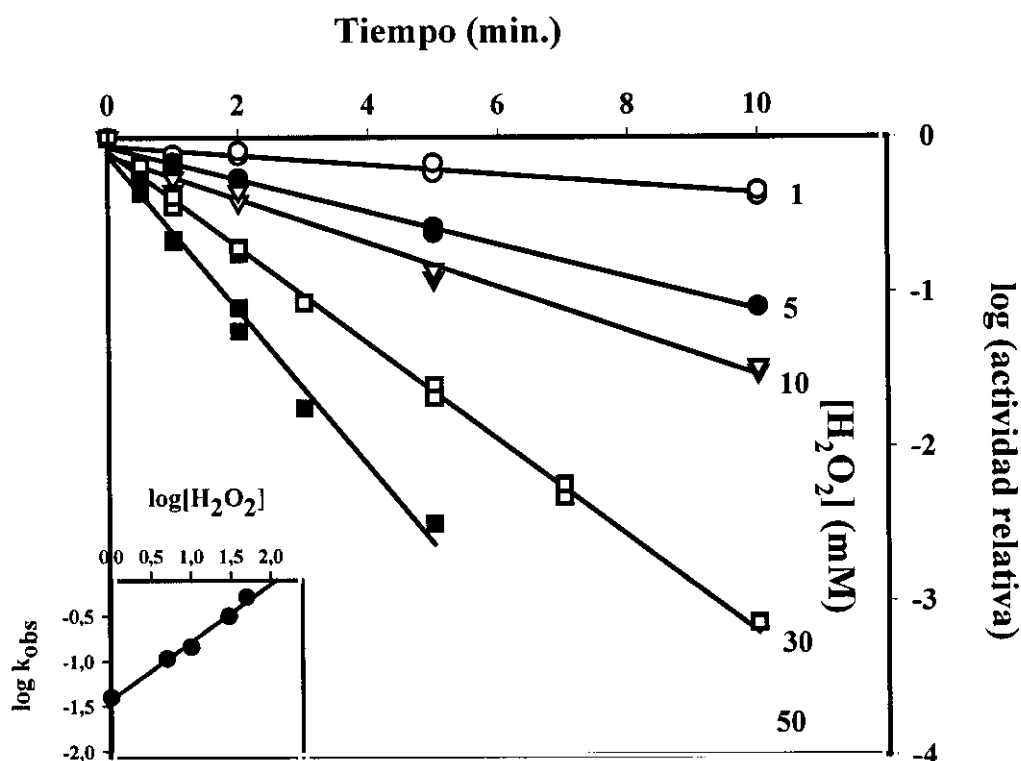


Figura 44. Inactivación con el tiempo de la apo-D-aminoácido oxidasa. Soluciones de apoenzima 0.7 μM fueron preincubadas con H_2O_2 como se describe en la Figura 43. Antes de ensayar la actividad enzimática residual (como se describe en la Figura 43) se reconstituyó la holoenzima mediante adición de FAD. **Recuadro interno:** logaritmo de la constante aparente de inactivación de primer orden (k_{obs}) frente al logaritmo de la concentración de H_2O_2 .

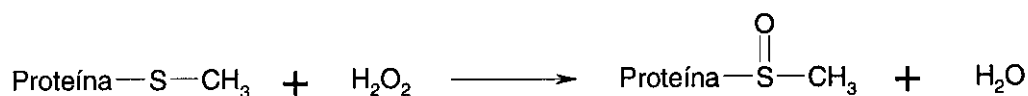
Sin embargo, la apoenzima es muy sensible al daño por peróxido de hidrógeno. La Figura 44 muestra también cinéticas de pseudoprimer orden aunque la constante de inactivación de segundo orden fue $3.12 \cdot 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, tres órdenes de magnitud más alta que en el caso de la holoenzima. En ambos casos el orden de la reacción fue cercano a 1, lo que indica que un mol de reactivo reacciona con un mol de enzima.

De estas observaciones se deduce que los residuos cuya oxidación conduce a la destrucción de actividad quedan protegidos, bien por el FAD, por la dimerización, o por algún cambio conformacional concomitante.

Se plantearon entonces dos incógnitas. Por un lado, qué tipo de residuo esencial es el que se oxida, y por otro, en qué etapa de la transición de apoproteína a holoenzima queda protegido de dicha oxidación. Después de despejar estas dos incógnitas, se esperaba poder establecer una hipótesis sobre la implicación de dicho(s) residuo(s) en la función de la DAAO.

4.2.2. Identificación de los residuos que se oxidan

El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante relativamente inespecífico que reacciona con una amplia variedad de compuestos orgánicos. No obstante, bajo condiciones relativamente suaves, este reactivo es altamente específico para un reducido número de cadenas laterales de aminoácido. En condiciones ácidas la reacción primaria es la conversión de residuos de metionina al sulfóxido correspondiente (Neumann, 1972).



El procedimiento típico de hidrólisis de proteínas (6 N HCl caliente, 110°C, 24 h) reduce el sulfóxido nuevamente a metionina. No obstante, la metionina puede cuantificarse indirectamente tratando la proteína oxidada con iodo[¹⁴C]acetato, el cuál alquila los residuos de metionina pero no los de sulfóxido de metionina. Fue posible demostrar que después del tratamiento de la D-aminoácido oxidasa con H₂O₂ ninguno de los residuos de metionina en la holo- o apoenzima resultaba modificado.

Teniendo en cuenta que otros residuos como cisteína, triptófano o tirosina pueden también ser atacados por H₂O₂, se llevaron a cabo experimentos encaminados a probar la posible modificación de otros residuos que pudiera ser responsable de la inactivación de la enzima.

El tratamiento de la holoenzima con H₂O₂ condujo a la oxidación de dos cisteínas (cada monómero contiene 6 cisteínas (Pilone y col., 1989); el mismo tratamiento sobre la apoenzima produjo la oxidación de una cisteína. Varios investigadores han sugerido la implicación de un grupo sulfhidrilo de la DAAO de riñón de cerdo y *Rhodotorula gracilis*, en la unión del FAD a la apoenzima (Casalin y col., 1991; Fonda y Anderson, 1969). Muy recientemente (Pollegioni y col., 1997), se ha demostrado la presencia de una cisteína reactiva en el dominio de unión de flavina de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*. Esta cisteína, identificada como Cys²⁰⁸, fue el único residuo que reaccionó covalentemente con un análogo de FAD. La enzima flavinilada resultó ser inactiva e incapaz de dimerizar. Por otra parte, el tratamiento de la holoenzima con reactivos para sulfhidrilos (Pollegioni y col., 1997) resultó en una inactivación limitada que no se afectó por la presencia de benzoato, un inhibidor competitivo de DAAO, o FAD exógeno; sin embargo, la apoproteína perdió toda su actividad en presencia de los mismos reactivos.

La rápida pérdida de actividad enzimática observada en la apoproteína al tratarla con H₂O₂ podría deberse a la oxidación de una cisteína, siendo esta diferente a la modificada en cada monómero de la holoenzima. No obstante, la apoenzima oxidada une FAD. La constante de disociación para el complejo FAD-apoenzima oxidada fue de 5.26x10⁻⁹. La correspondiente al complejo FAD-apoenzima nativa fue 9.2x10⁻⁹ lo que indica que el FAD se une a ambos estados de la proteína con similar afinidad. Según los resultados de Pollegioni y col. (Pollegioni y col., 1997), previamente mencionados, algún otro residuo de cisteína diferente de la cisteína 208 podría ser el responsable de la pérdida de actividad enzimática inducida por H₂O₂.

Dado que se ha demostrado que la oxidación de triptófano por H_2O_2 ocurre óptimamente entre pH 8 y 10 (Hachimori y col., 1964), las titulaciones de triptófanos en la holo- y la apoenzima antes y después del tratamiento con H_2O_2 fueron llevadas a cabo.

Los espectros de emisión de fluorescencia para diferentes formas de la enzima se muestran en la Figura 45. Se observó un importante cambio en la emisión de fluorescencia entre la apoenzima nativa y la tratada con H_2O_2 , lo que indica que el H_2O_2 oxida triptófanos en la apoenzima (Figura 45A). Adicionalmente, se observa un pequeño cambio entre la holoenzima nativa y la tratada con H_2O_2 , lo que indica que algunos de los triptófanos oxidados en la apoenzima quedan protegidos en la holoenzima. Por otra parte, la holoenzima mostró un espectro más estructurado (Figura 45B) probablemente porque la unión del FAD y la dimerización entierran algunos grupos indol evitando su contacto con el entorno polar.

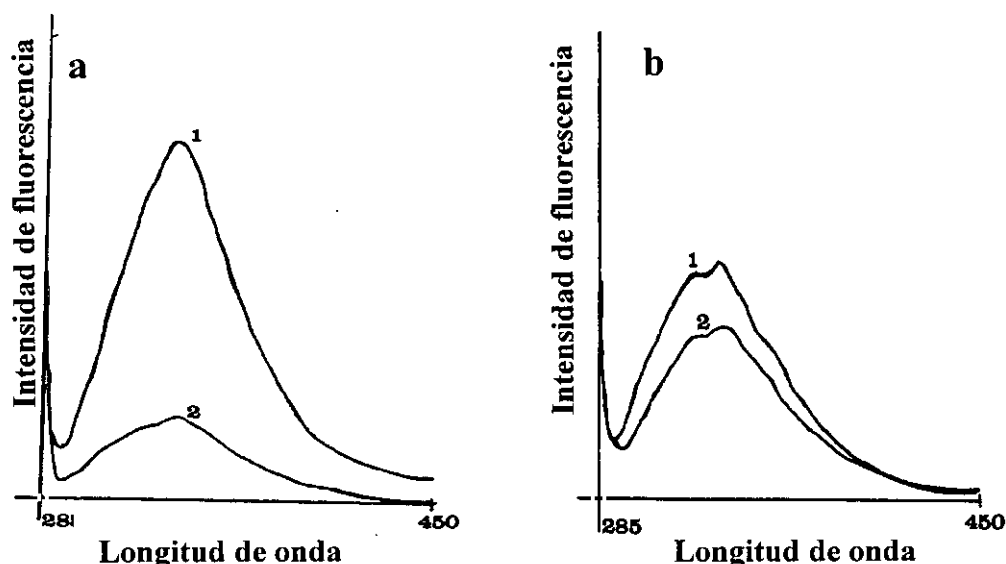


Figura 45. Espectros de emisión de fluorescencia de las formas apo y holo de la DAAO antes y después de tratamiento con H_2O_2 . Muestras de apoproteína (a) y holoenzima (b) fueron sometidas a oxidación con H_2O_2 durante 30 minutos y 12 horas, respectivamente, y se registraron espectros de emisión de fluorescencia de las muestras control (1, amplificación=3) y oxidadas (2, amplificación=10).

Es sabido que el contacto del núcleo indólico con moléculas de disolventes polares apantalla la emisión de fluorescencia estructurada y ensancha el espectro de absorción. La apoenzima también mostró un ensanchamiento en su espectro de absorción en comparación con el de la holoenzima (datos no mostrados).

Estos resultados ponen de manifiesto que el H_2O_2 oxida residuos de triptófano de la DAAO, siendo esta modificación más acusada sobre la forma de apoproteína, con una disminución del 88% en la intensidad de fluorescencia tras sólo 30 minutos de incubación con H_2O_2 10 mM a 30°C , que sobre la holoenzima, que presenta una reducción del 68% tras 12 horas con H_2O_2 50 mM a la misma temperatura. La oxidación de triptófanos, seguida por espectroscopía de fluorescencia, muestra correlación con la inactivación durante el tratamiento de DAAO con peróxido de hidrógeno. La

espectroscopía de absorción corrobora la oxidación de residuos de Trp y descarta la de Tyr ya que, al igual que en la modificación con NBS, aparece un mínimo a 280 nm en los espectros de diferencia.

4.2.3. Determinación funcional de los residuos que se oxidan

Tras la identificación de los residuos de triptófano como responsables de la inactivación observada durante la oxidación de DAAO con H_2O_2 , y tras comprobar que estos son menos vulnerables a la modificación en la forma activa de la DAAO, nos propusimos estudiar el proceso de reconstitución de holoenzima tras la oxidación de la apoproteína.

Durante la reconstitución de la holoenzima ocurren varios eventos, de los cuáles al menos uno debe verse perturbado por la presencia de algún triptófano oxidado. La Figura 46 ilustra esta secuencia de eventos, que incluye cambios conformacionales en la proteína y en la flavina.

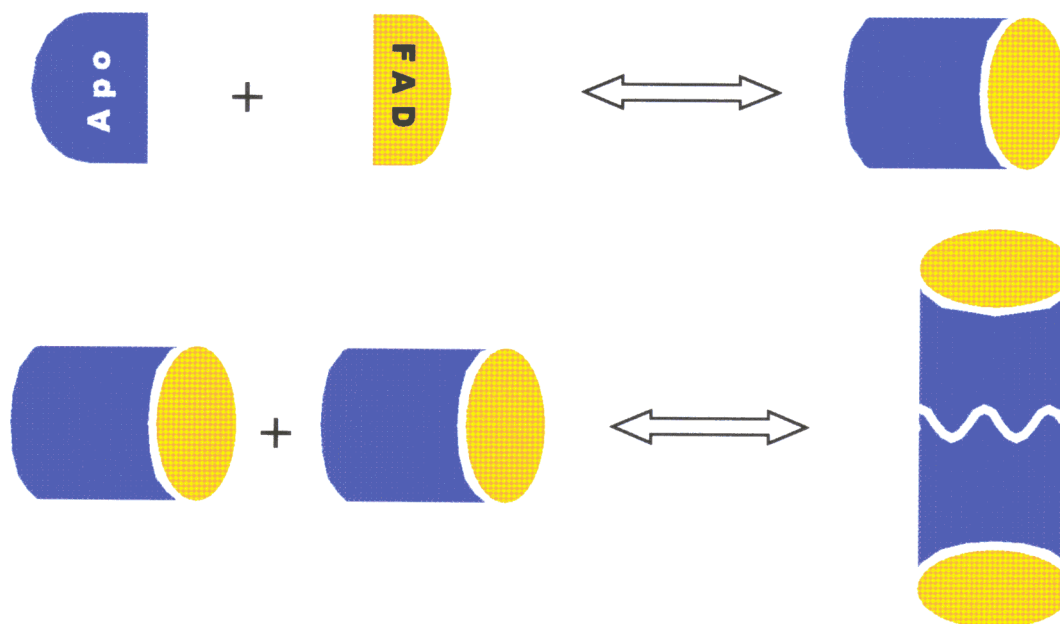


Figura 46. Representación esquemática del proceso de reconstitución de la holoenzima de la DAAO. Se ilustran los cambios conformacionales en la proteína (Apo) y en la flavina (FAD) durante la asociación (arriba) y la dimerización (abajo).

En primer lugar se repitió el seguimiento del proceso de asociación por apantallamiento de la fluorescencia flavínica usando una preparación de apoproteína oxidada con H_2O_2 . El proceso de unión mostró el mismo comportamiento que la apoproteína no oxidada, permitiendo el cálculo de una constante de disociación de $5.0 \cdot 10^{-9}$ M, en concordancia con el valor obtenido entonces de $9.2 \cdot 10^{-9}$ M. Este resultado descarta la implicación de los triptófanos oxidados en la unión del FAD y reduce el ámbito de su participación a la dimerización o a la actividad (enlace del sustrato, conformación del centro activo o, menos probablemente, catálisis).

Una vez descartada la implicación de el(los) triptófano(s) susceptibles de oxidación con H_2O_2 en la unión del cofactor, se estudió su posible implicación en la interacción entre monómeros para formar la forma activa de la DAAO: el dímero.

Los cromatogramas obtenidos en HPLC (en columna Biosep-Sec 3000, Figura 47) evidencian una clara afección del equilibrio monómero/dímero cuando el H_2O_2 ha oxidado algún triptófano.

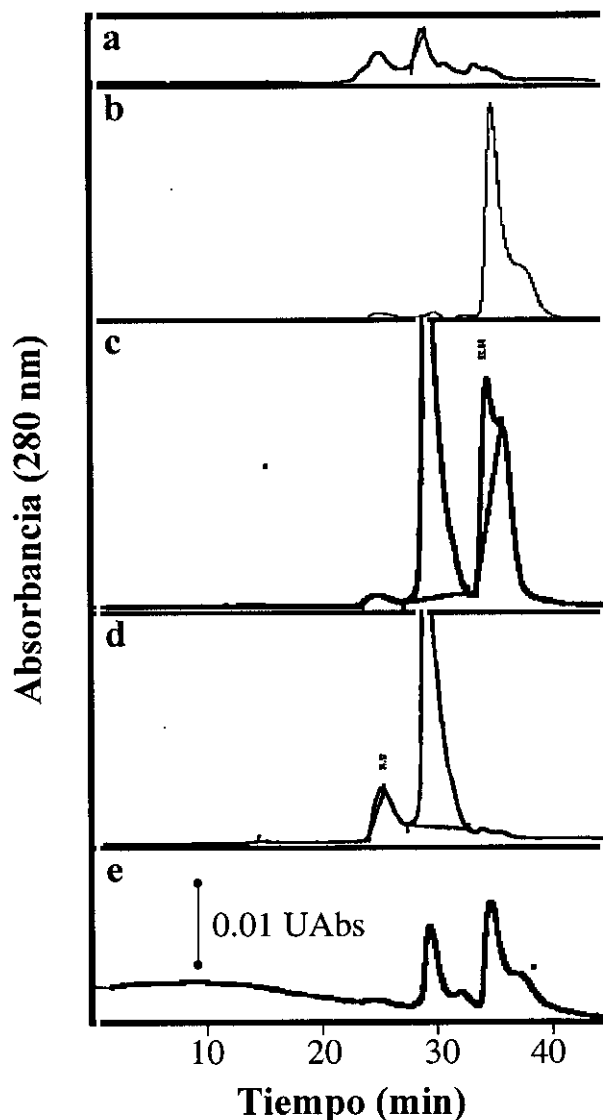


Figura 47. Análisis por HPLC de la oligomerización de DAAO tras oxidación con H_2O_2 . Se muestran los cromatogramas de apoproteína control (a), oxidada (b) y reconstituida tras oxidación (c), así como de holoenzima control (d) y oxidada (e). La escala de ordenadas se muestra en unidades de absorbancia (UAbs)

La oxidación con H_2O_2 genera una perturbación en el perfil cromatográfico de la apoproteína, incluso tras la reconstitución con FAD. La holoenzima sufre la misma perturbación. El pico atribuido al dímero (78 kDa, ≈ 30 min) disminuye en favor del atribuido al monómero (39 kDa, ≈ 35 min).

Por otra parte, la inactivación de holo- y apoenzima por H_2O_2 no se afectó por la presencia de benzoato, un inhibidor competitivo de la D-aminoácido oxidasa (Massey y Curti, 1966). La D-alanina tampoco protegió a la enzima de la inactivación. Estos resultados indican que los residuos modificados no están cerca del centro catalítico.

5. MECANISMO QUÍMICO

El análisis del mecanismo químico nos permite conocer cómo ocurren los procesos que tienen lugar en la superficie enzimática, a través de qué tipo de reacciones discurren (ruptura y formación de enlaces, orden en que se producen y la base química en que se fundamentan) y qué residuos están implicados en la catálisis (Cleland, 1977; Eyzaguirre, 1987).

En nuestro caso hemos abordado el estudio del mecanismo químico de la reacción catalizada por la DAAO de *Rhodotorula gracilis* mediante experimentos de variación de pH y modificación química con reactivos específicas de grupos esenciales implicados en la catálisis.

5.1. Estudios de variación de pH

La variación de los parámetros cinéticos de la reacción de la DAAO con D-alanina con el pH fue analizada para extraer los valores de pK de los residuos cuyos estados de ionización afectan significativamente la actividad enzimática. La variación de estos pK 's deducidos con la temperatura también se estudió para obtener información adicional sobre estos residuos.

Los valores de V_{max} y V_{max}/K_M para la D-alanina fueron determinados en el intervalo de pH 5.5-10.5. La Figura 48 muestra la variación con el pH de estos dos parámetros cinéticos.

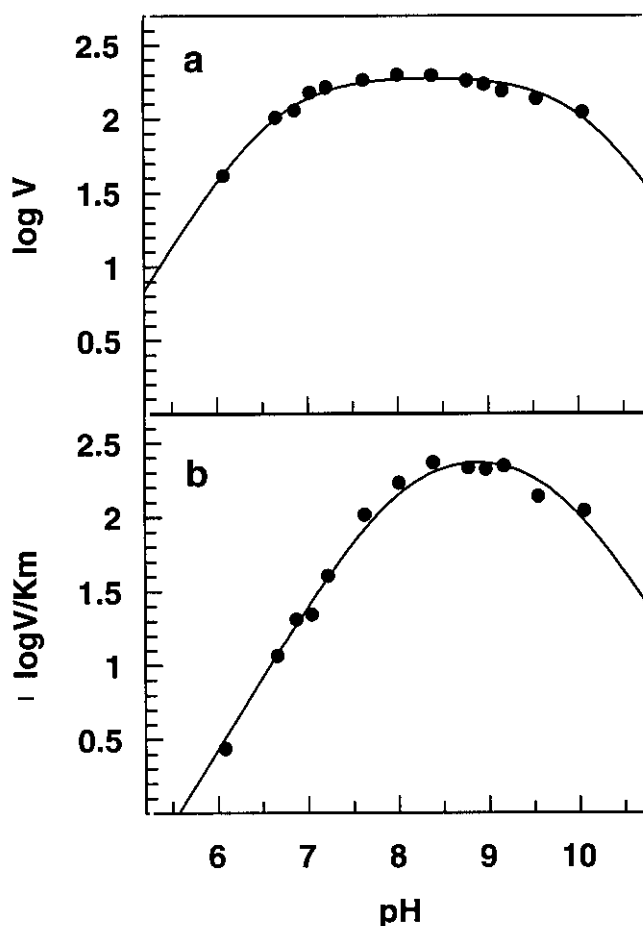


Figura 48. Curvas de pH de V_{\max} (a) y V_{\max}/K_M (b) para la reacción de DAAO con D-alanina. Los puntos individuales representan ajustes de velocidades iniciales a concentración saturante de O_2 y varias concentraciones de D-alanina a la ecuación 28. La curva a través de los puntos es un ajuste iterado a la ecuación 29.

La velocidad máxima mostró disminuciones tanto a pH's altos como bajos con pendientes límite de -1 y 1 respectivamente (Figura 48A) y los datos se ajustaron a la ecuación 29 (pág. de *Materiales y Métodos*). Los datos indicaban que un grupo con un valor de pK aparente de 6.26 (pK_1) debe estar desprotonado y otro con un pK aparente de 10.80 (pK_2) debe estar protonado para la actividad. El perfil de V_{\max}/K_M (Figura 48B) mostró una forma similar y los datos indicaron la existencia de un pK aparente de 7.95 (pK_1) en la región ácida y otro de 9.90 (pK_2) en la zona básica (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de pK deducidos a partir de los perfiles de V_{\max} y V_{\max}/K_M frente al pH.

	pK_1	pK_2
Perfil de V_{\max}	6.26 ± 0.04	10.80 ± 0.15
Perfil de V_{\max}/K_M	7.95 ± 0.05	9.90 ± 0.15

No obstante, antes de atribuir los valores de pK aparentes deducidos a partir de los perfiles de pH a residuos de la enzima, hay que tener en cuenta que el sustrato es también susceptible de ionizaciones y que no todos los estados de ionización se unen y/o son catalíticamente competentes. Los valores de pK de los grupos ionizables de la alanina libre son de 2.3 y 9.7 para el carboxilo y el amino respectivamente. Cuando los pK 's observados en el perfil de V_{\max}/K_M fueron recalculados asumiendo que sólo la forma zwitteriónica del sustrato es activa, el valor de pK de la región ácida permaneció inalterado, mientras que en la zona alcalina no se observó ningún pK , lo que indica que el grupo amino del sustrato era el responsable del pK_2 observado.

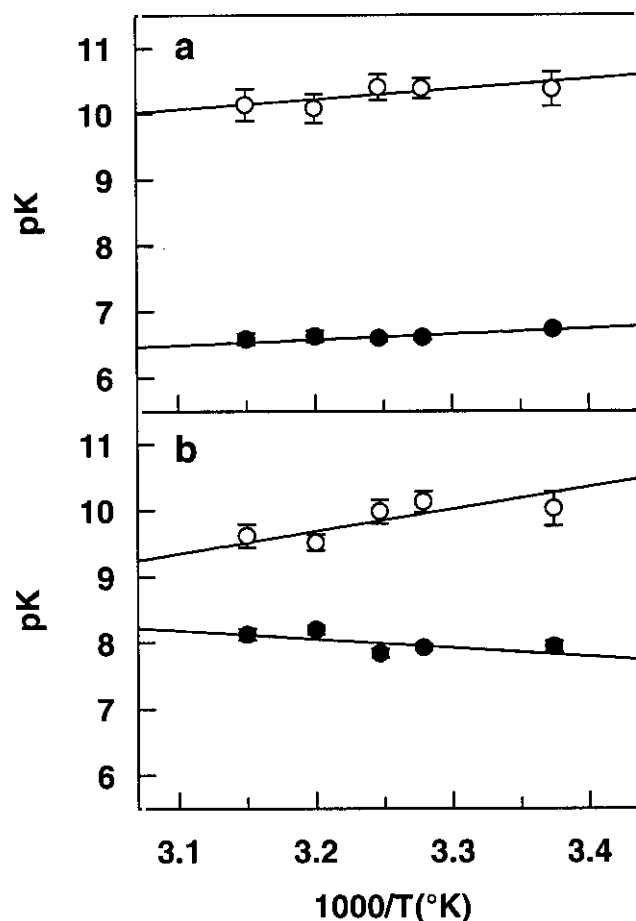


Figura 49. Variación con la temperatura de los valores de pK extraídos de los perfiles de V_{\max} (a) y V_{\max}/K_M (b). Experimentos similares a los referidos en la Figura 48 se condujeron a 4 temperaturas adicionales y los valores de pK_1 (●) y pK_2 (○) fueron representados y ajustados a la ecuación de Van't Hoff (ec. 32).

Para obtener más información sobre los grupos cuyo estado de protonación afecta a la actividad, se estudió la dependencia con la temperatura de los perfiles de V_{\max} y V_{\max}/K_M (Figura 49). Los experimentos se llevaron a cabo a 20, 32, 35, 40 y 45°C. En el intervalo de pH usado no se observó inactivación térmica irreversible de la enzima. Las entalpías de ionización (ΔH_{ion}) calculadas mediante ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Van't Hoff se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Entalpías de ionización. Las entalpías correspondientes a las ionizaciones observadas en las curvas de pH fueron calculadas mediante ajuste de los datos de la Figura 48 a la ecuación 32.

	pK_1	pK_2
Perfiles de V_{\max}	2.77 ± 0.37 kcal/mol	6.08 ± 0.25 kcal/mol
Perfiles de V_{\max}/K_M	5.07 ± 0.32 kcal/mol	11.07 ± 0.70 kcal/mol

Más información acerca de la naturaleza de los grupos catalíticos se obtuvo del estudio del efecto de la adición de un disolvente orgánico sobre los valores de pK tanto en tampones ácido-neutros como en catiónicos (Tabla 12). La adición de DMSO al 20% (v/v) causó una disminución en el valor de pK_1 observado en tampones ácido-neutros, mientras que este pK no se alteró en tampones catiónicos, lo que indica que el grupo responsable de este pK es de tipo catiónico. Por otro lado, la adición de DMSO al 20% hizo desaparecer el pK_2 observado en el perfil de V_{\max} tanto en tampones ácido-neutros como en los catiónicos y no cambió significativamente en el perfil de V_{\max}/K_M .

Tabla 12. Efecto del DMSO al 20% sobre los valores de pK en tampones ácido-neutros y catiónicos. Los valores de pK y sus desviaciones típicas fueron obtenidos por análisis estadístico de los datos de parámetros cinéticos según la ecuación 29.

		Tampones ácido-neutros		Tampones catiónicos	
		-DMSO	+DMSO	-DMSO	+DMSO
log V_{\max}	pK_1	6.59 ± 0.05	6.37 ± 0.02	6.78 ± 0.06	6.74
	pK_2	10.40 ± 0.20	-----	10.52 ± 0.28	-----
log V_{\max}/K_M	pK_1	7.84 ± 0.06	7.09 ± 0.08	7.38 ± 0.08	7.39 ± 0.13
	pK_2	9.98 ± 0.18	10.27 ± 0.32	9.93 ± 0.07	10.06 ± 0.18

El perfil de pK_i para un inhibidor muestra el efecto de ionizaciones únicamente sobre la unión y no sobre la catálisis y tiene la ventaja de proporcionar valores muy fiables de pK (Cleland, 1997). Los perfiles de V_{\max} y V_{\max}/K_M muestran el efecto de ionizaciones sobre la catálisis y la unión y, por ello, la comparación de los dos tipos de perfiles es muy útil para la identificación de residuos implicados en la catálisis por un lado y de los involucrados solamente en la unión por otro. La variación con el pH de K_i fue estudiada usando D-aspartato como inhibidor competitivo de la reacción con D-alanina (Figura 50). Tras el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 31, se obtuvo un valor de 8.40 ± 0.17 para el pK de la única ionización detectada en el perfil de pK_i frente a pH. Esta observación indica que un grupo con un pK de 8.4 debe estar protonado para que el inhibidor se una. El cálculo de este valor de pK incluye la corrección correspondiente a la ionización del grupo amino del inhibidor ($pK_2=9.82$).

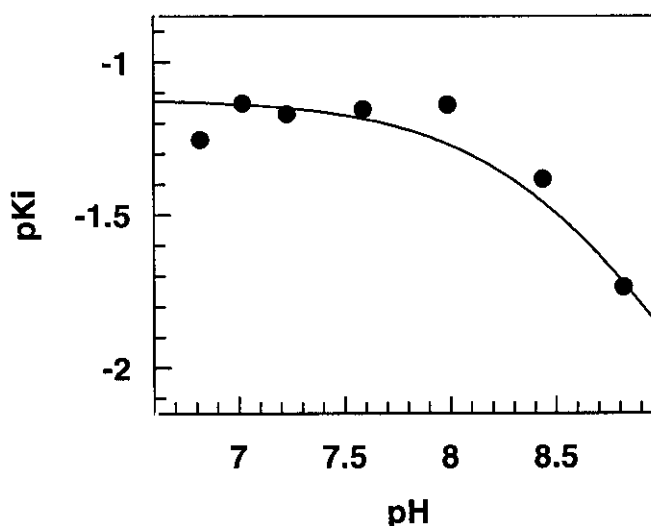


Figura 50. Variación de pK_i con el pH para el ácido D-aspártico. Los experimentos se llevaron a cabo como en la Figura 48 variando la concentración de D-aspartato desde 0 hasta 13 mM. Los valores de K_i fueron obtenidos del ajuste de los datos a la ecuación 30 y los valores de pK_i se representaron frente al pH y se ajustaron a la ecuación 31 con corrección para la ionización del inhibidor ($pK_{\text{amino}} = 9.82$).

5.2. Modificación química de residuos de DAAO

Además de la información que se puede extraer de experimentos cinéticos acerca de la naturaleza de los residuos implicados en la reacción catalizada por una enzima, el uso de modificadores específicos de cadenas laterales de aminoácidos permite corroborar o descartar implicaciones previamente sugeridas.

5.2.1. Modificación de tirosinas

La descripción bibliográfica de la existencia de tirosinas esenciales en los centros activos de otras oxidasas como la DAAO de riñón de cerdo nos impulsó a probar la inactivación de la DAAO de *Rhodotorula gracilis* por reactivos específicos de tirosinas.

La modificación de residuos de tirosina en la apoproteína y en la holoenzima de DAAO fue realizada usando TNM y N-acetilimidazol. En ninguno de los casos se observó pérdida significativa de la actividad enzimática. Este resultado va en detrimento de las hipótesis planteadas acerca de la esencialidad de residuos de tirosina en la DAAO de *Rhodotorula gracilis*, por analogía con otras flavoproteínas (Pollegioni y col., 1994; Watanabe y col., 1989; Macheroux y col., 1993; Rouviere-Fourmy y col., 1994).

5.2.2. Modificación de histidinas con DEP

Otro tipo de residuos descritos como esenciales en otras oxidasas, incluyendo la DAAO de riñón de cerdo, son los de histidina. La posibilidad de que también en la enzima de esta levadura fuese esencial un residuo de histidina nos animó a probar la inactivación de la enzima por un reactivo con la especificidad requerida: el dietilpirocarbonato (DEP).

5.2.2.1. Cinética de inactivación

La DAAO perdió su actividad catalítica tras tratamiento con DEP (Figura 51). Los estudios de inactivación se llevaron a cabo usando concentraciones de inhibidor (0.05-1 mM) mucho mayores que la concentración de enzima (0.66 μM) con el fin de asegurar que el DEP está en suficiente exceso durante el periodo de incubación.

El DEP es inestable en soluciones acuosas. Su descomposición siguió una cinética de pseudo primer orden con una constante de velocidad de 0.140 min^{-1} . Para incluir la hidrólisis del reactivo en el análisis de los datos de inhibición, se representaron las fracciones de actividad residual frente a t' , que es el tiempo de incubación corregido según la ecuación 33.

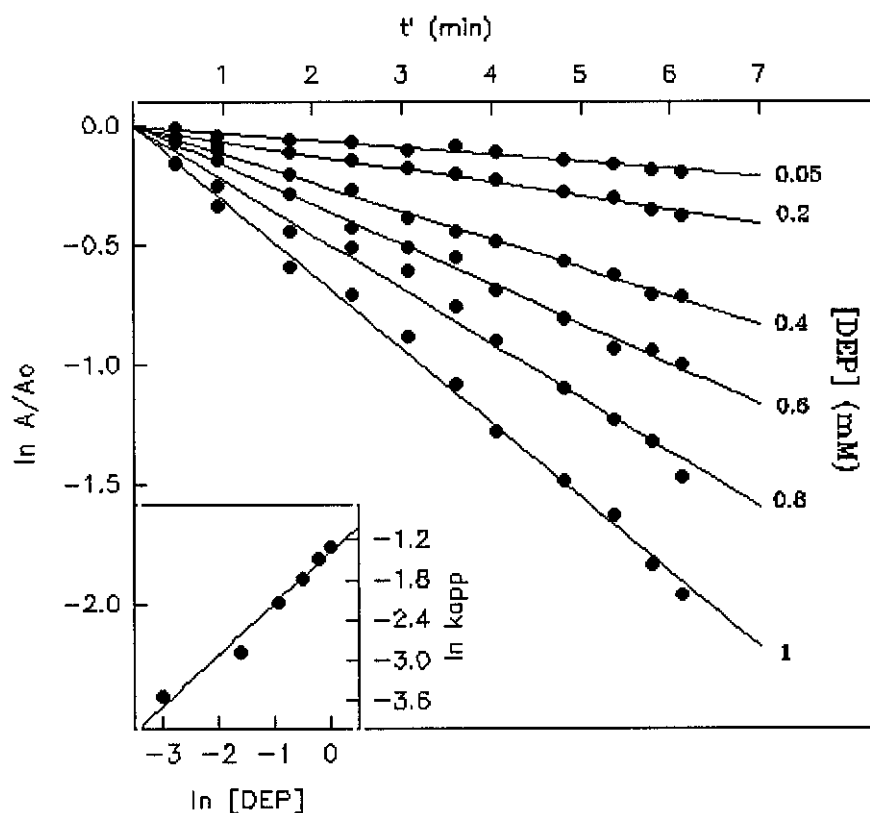


Figura 51. Cinéticas de inactivación de la DAAO por DEP. La enzima (2.5 μg) en 100 μl de tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7.5 se incubó 6.2 μl de una solución etanólica de DEP a las concentraciones indicadas. La actividad remanente se ensayó a los tiempos indicados tras adición de D-fenilglicina hasta 25 mM. El gráfico interior es una representación secundaria del logaritmo de las constantes de velocidad de pseudo-primer orden frente al logaritmo de la concentración de DEP (mM)

Los patrones de inactivación fueron lineales, lo que indica un comportamiento cinético de pseudo primer orden. La constante de velocidad de segundo orden fue calculada a partir de una representación secundaria logarítmica (Figura 51, representación interior) de las diferentes k_{app} frente a la concentración de DEP de acuerdo con la ecuación 34 (pág 59 de *Materiales y Métodos*). Del intercepto en el eje de ordenadas de dicha representación se dedujo una constante de segundo orden (k) de $0.254 \pm 0.006 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. La pendiente de este gráfico rindió un orden de reacción (n) de 0.779 ± 0.019 .

5.2.2.2. Especificidad de la reacción

Con el objeto de descartar la modificación de residuos tales como lisina o cisteína con el DEP, la enzima carbetoxilada fue tratada con hidroxilamina 1M o NaOH 100 mM, compuestos capaces de revertir la modificación de histidinas o tirosinas con DEP (Miles, 1977). Los resultados de la Figura 52 indican que la totalidad de la actividad inicial se recupera tras incubación prolongada con NaOH y aproximadamente un 80% es rescatado tras la incubación con hidroxilamina. De esta forma, la inactivación puede atribuirse a la modificación de residuos de histidina y/o tirosina.

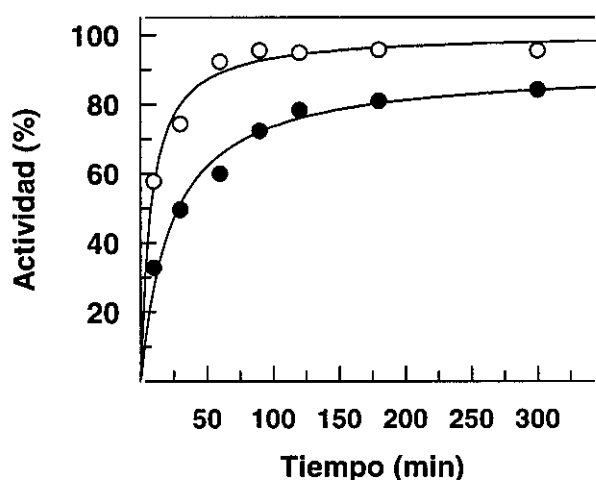


Figura 52. Reversión de la inactivación de la enzima modificada con DEP. La carbetoxi-DAAO fue tratada con 1 M hidroxilamina a pH 7.0 (●) o 0.1 M NaOH (○) durante los tiempos indicados. La actividad recuperada se midió tras retirar la hidroxilamina o neutralizar el NaOH.

La carbetoxilación de histidinas puede distinguirse de la de tirosinas por espectroscopía diferencial. Cuando lo que se modifica es histidina, se produce un incremento de absorbancia a 242 nm, mientras que al formarse *O*-carbetoxitirosina disminuye la absorbancia a 280 nm.

La Figura 53 muestra los espectros de diferencia para la reacción de la DAAO con DEP. En ella se observa que la absorbancia a 280 nm permanece prácticamente inalterada durante la modificación, mientras que el aumento de A_{242} muestra correlación con la pérdida de actividad enzimática (Figura 53, representación interior).

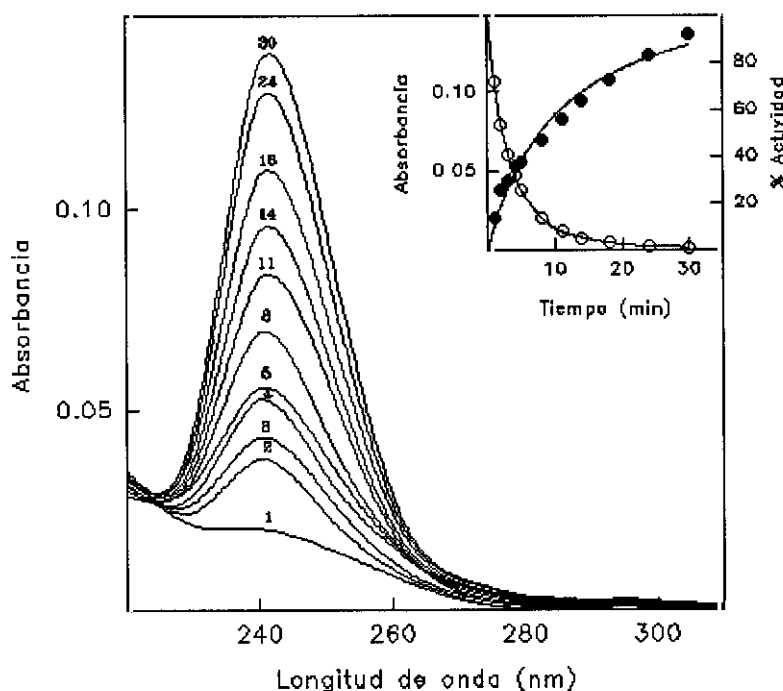


Figura 53. Espectros de diferencia de la reacción de la DAAO con DEP. Una muestra de DAAO 5 μM se trató con DEP 1 mM y se registraron espectros de diferencia a diferentes tiempos. La representación interior muestra la correlación de la inactivación de la DAAO (○) con el aumento de absorbancia a 242 nm (●).

Las representaciones semilogarítmicas del aumento de absorbancia ($1-A/A_0$) frente al tiempo (t') resultaron ser lineales (Figura 54) y de ellas se extrajeron las correspondientes constantes de velocidad de pseudo primer orden. De la representación logarítmica de estas constantes frente a la concentración de DEP (Figura 54, representación secundaria) se pudieron deducir una constante de velocidad de segundo orden de $0.230 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ y un orden de reacción de 0.682. Ambos valores están en concordancia con los obtenidos a partir de los estudios cinética de inactivación (Figura 51, representación secundaria).

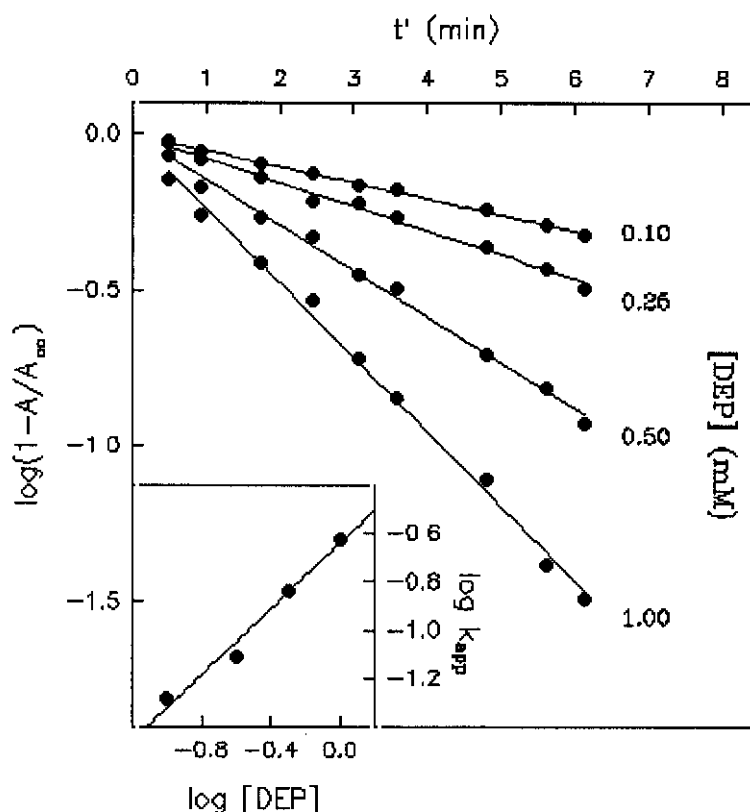


Figura 54. Representación semilogarítmica de los incrementos de absorbancia a 242 nm durante la modificación de DAAO con DEP. Muestras de DAAO 5 μ M fueron tratadas con DEP entre 0.1 y 1.0 mM. La representación interior relaciona las constantes de velocidad de pseudo-primer orden con la concentración del modificador.

5.2.2.3. Efecto del pH sobre la inactivación de DAAO por DEP

Evidencia adicional de la modificación de histidinas se obtuvo al estudiar la dependencia de la reacción de modificación con el pH (Figura 55). Las inversas de las constantes de inactivación de pseudo primer orden se representaron frente a $[H^+]$ según

$$1/k_{app} = 1/k_2 + [H^+]/(k_2 \cdot K_a) \quad (41)$$

donde k_{app} es la constante de inactivación de pseudo primer orden a cada pH, k_2 es la constante de velocidad de pseudo primer orden de modificación del residuo desprotonado y K_a es la constante aparente de disociación de la forma ácida de la enzima. Del intercepto y la pendiente de dicha representación se dedujeron valores de $0.226 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para k_2 y 6.6 para el pK_a del residuo modificado, el cuál concuerda con un residuo de histidina.

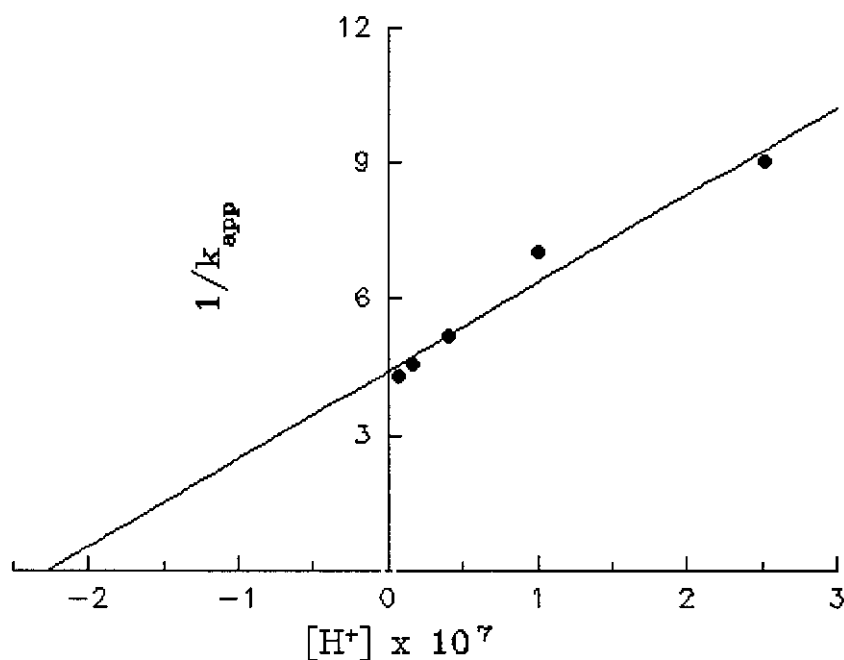


Figura 55. Dependencia del pH de la inactivación de DAAO por DEP. La enzima, 2.5 μ g en 100 μ l de tampón fosfato/pirofosfato se incubó a diferentes valores de pH (6.2-10.2). Se calcularon las constantes de velocidad de pseudo-primer orden a cada pH con DEP 1 mM y se representaron frente a la concentración de hidrogeniones.

5.2.2.4. Extensión de la modificación. Cálculo del número de histidinas esenciales

La inactivación de DAAO por DEP se correlacionó con el número de histidinas modificadas calculado mediante espectroscopía diferencial a 242 nm. El número de residuos necesarios para una completa inactivación de la enzima, deducido por extrapolación a actividad 0, fue 5 (Figura 56A). El número de residuos esenciales se obtuvo mediante el procedimiento descrito por Tsou (1962), el cuál hace uso de la ecuación de Tsou (ec.35, pág. 59 de Materiales y Métodos).

Como se observa en la Figura 56B, un comportamiento lineal aceptable ($r=0.9989$) se obtuvo para valores de $n=10$, $p=5$ e $i=1$, lo que indica que sólo un residuo de histidina es esencial para la actividad enzimática. El valor de a fue de 0.00264, lo que indica que el grupo de 5 residuos que reaccionan rápidamente, lo hace con una velocidad 378 veces superior a la correspondiente al grupo que reacciona lentamente.

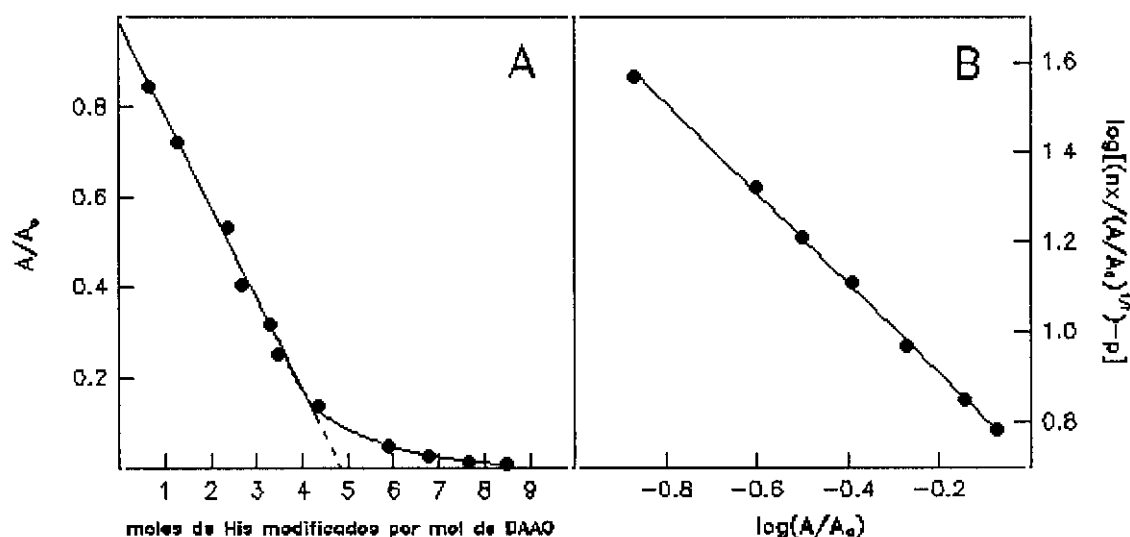


Figura 56. (A) Representación de la actividad residual frente al número de residuos modificados (datos de la Figura 51). (B) Representación de Tsou de los datos de (A). El mejor ajuste de los datos experimentales se obtuvo con los valores $n=10$, $p=5$ e $i=1$.

5.2.2.5. Estudios de protección

Con el fin de determinar la localización del residuo de histidina esencial para la catálisis se llevaron a cabo estudios de protección del centro activo frente a la inactivación de la DAAO por DEP.

El benzoato es un inhibidor competitivo que se une al centro activo de la enzima (Curti y col., 1992). Como se observa en la Figura 57, tanto el benzoato como el sustrato D-fenilglicina protegen a la enzima de la inactivación por DEP. Estas observaciones refuerzan la tesis de que un residuo esencial de histidina localizado en el centro activo de la enzima es el responsable de la inactivación de DAAO por DEP.

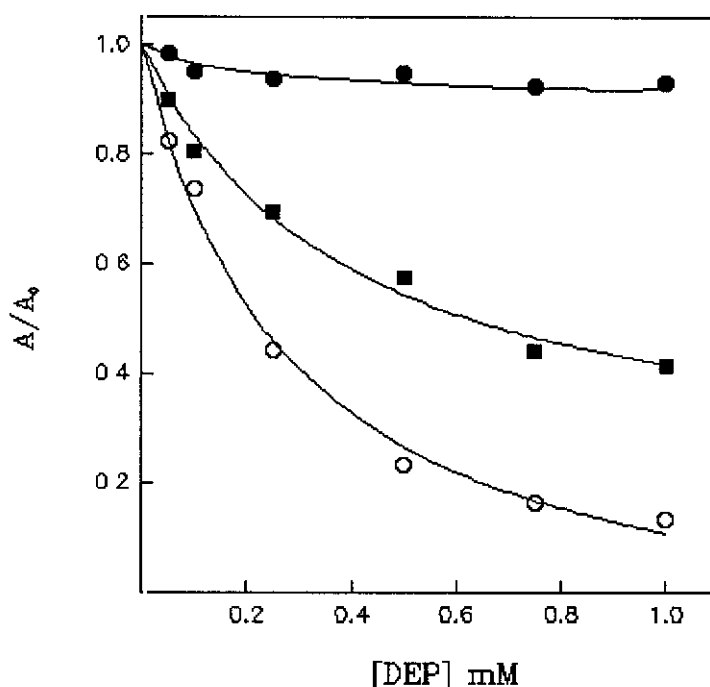


Figura 57. Protección por benzoato o D-fenilglicina de la inactivación de DAAO por DEP. La enzima fue modificada con DEP 1 mM en ausencia de protector (○), y tras preincubación con D-fenilglicina 2.5 mM (●) o benzoato 3.6 mM (■).

La His³⁰⁷ ha sido propuesta como esencial en la DAAO de riñón de cerdo y está conservada en todas las DAAO's (y la D-aspartato oxidasa de *Bos taurus*), correspondiendo a la His³²⁹ en la enzima de *Rhodotorula gracilis* (Figura A4 del 'Apéndice'). Adicionalmente, la glicolato oxidasa y la L-lactato oxidasa presentan una histidina esencial encargada de abstraer el protón α del sustrato (Macheroux y col., 1993). Por todas estas razones nos propusimos, en colaboración con el laboratorio del Dr. José Luis García del Centro de Investigaciones Básicas del C.S.I.C., confirmar la esencialidad de la His³²⁹ para la reacción catalizada por la DAAO de *Rhodotorula gracilis* por mutagénesis dirigida de este residuo. La mutación H329L produjo la pérdida total de actividad catalítica sin alteración detectable de la estructura secundaria de la enzima.

5.2.3. Modificación de triptófanos con NBS

En el caso de la DAAO de riñón de cerdo se ha descrito la presencia de un residuo de triptófano en el centro activo de la enzima. Por ello y con el fin de ahondar en la comprensión del mecanismo químico de la reacción catalizada por la DAAO de *Rhodotorula gracilis*, se llevaron a cabo estudios de la modificación de la enzima con reactivos específicos de triptófanos.

La modificación de los residuos de triptófano de la DAAO se llevó a cabo, en primer lugar, con BNPS-Skatol. La DAAO perdió totalmente su actividad tras 30 minutos de incubación con el reactivo de triptófanos BNPS-Skatol a concentraciones por encima de 1 mM a 25°C y pH 7.5. La capacidad de este reactivo de romper la cadena polipeptídica por la parte carboxílica de residuos de triptófano impide la atribución de la inactivación observada a la modificación específica de algún residuo esencial de triptófano.

Se seleccionó entonces otro reactivo de triptófanos, la NBS, para probar la esencialidad de residuos de triptófano en la DAAO. La enzima perdió rápidamente su actividad al ser tratada con este reactivo. Con el fin de caracterizar la modificación se procedió a realizar una serie de estudios que se describen a continuación.

5.2.3.1. Cinética de inactivación

En primer lugar, se estudió la cinética de inactivación por NBS tanto de la apo- como de la holoenzima. La Figura 58 muestra los valores de actividad residual obtenidos a distintos tiempos tras la adición de diferentes concentraciones de este modificador sobre preparaciones de apoproteína u holoenzima. Tal como se observa, todos los triptófanos susceptibles de modificación se oxidan durante el primer minuto de reacción. Del tramo lineal de inactivación temporal se extrajeron las constantes de pseudo-primer orden (k_{app}). Estas, a su vez, se representaron frente a la concentración de NBS en forma logarítmica para deducir las constantes de velocidad de segundo orden (k) según:

$$\log k_{app} = \log k + \log [\text{NBS}] \quad (42)$$

De los interceptos de estas representaciones secundarias se dedujeron valores de $k_{apo}=69.8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ y $k_{holo}=0.63 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Las pendientes de estas gráficas corresponden al orden de reacción y fueron próximas a 1 en el caso de la apoproteína y 2 en el de la holoenzima, lo que indica que un mol de NBS reacciona con un mol de apoenzima y 2 moles de NBS lo hacen con cada mol de holoenzima.

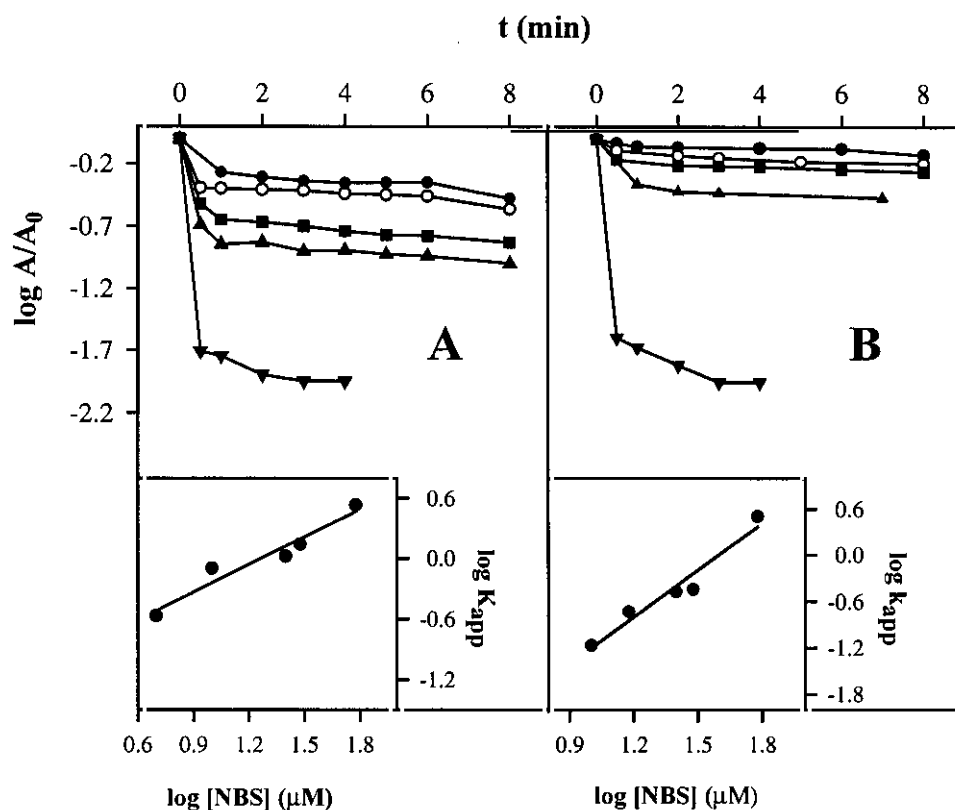


Figura 58. Cinética de inactivación de DAAO por NBS. Se representan los logaritmos de la actividad relativa a diferentes tiempos tras la adición de NBS 5 μM (●), 10 μM (○), 25 μM (■), 30 μM (▲) o 60 μM (▼) sobre preparaciones 0.7 μM de apoproteína (A) y de holoenzima (B). En las representaciones logarítmicas secundarias se representan las constantes observadas de pseudo primer orden (k_{app}) frente a la concentración del modificador.

5.2.3.2. Extensión y especificidad de la modificación

La oxidación de residuos de triptófano con NBS puede también seguirse por espectroscopía diferencial (Spande y Witkop, 1967). Esta técnica permite además detectar la posible modificación de tirosinas por este reactivo. Al reaccionar la NBS con triptófanos se observa la aparición de un mínimo a 280 nm en los espectros de diferencia correspondiente a la formación de oxoindol, mientras que en la reacción con tirosinas la absorbancia a 280 aumenta y aparece un máximo a 260 nm (Ohnishi y col., 1980). Los espectros de diferencia obtenidos al tratar muestras de apoproteína y holoenzima (Figura 59) tienen las características propias de la oxidación de triptófanos y la posible modificación de tirosinas, si existe, debe ser despreciable frente a la anterior. De hecho, el punto isosbético observado a 263 nm descarta la oxidación de tirosinas a estructuras dienónicas.



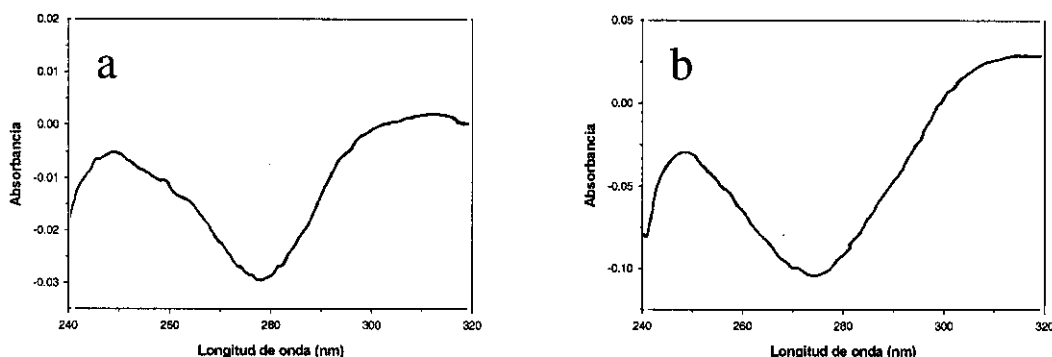


Figura 59. Espectros de diferencia de la apoproteína (a) y la holoenzima (b) tratadas con NBS respecto a muestras equivalentes sin tratar. Los espectros mostrados corresponden a mezclas en las que la relación NBS/Trp producía la máxima modificación.

La Figura 60 muestra la actividad DAAO (%) y la A_{280} (%) frente a la extensión de la modificación de triptófanos (moles de Trp oxidados por mol de proteína). Tanto en el caso de la apoproteína como de la holoenzima, las variaciones en actividad y en absorción de luz fueron paralelas y la destrucción de 2 residuos de triptófano, para la que se requería una relación molar de NBS:monómero de 3:1, condujo a la pérdida total de actividad y de absorbancia a 280 nm.

El consumo de NBS no excedió 1.5 moles de reactivo por mol de triptófano oxidado. Este valor apunta a la modificación selectiva de triptófanos ya que el consumo de reactivo durante la modificación de otros residuos como tirosina es mucho más alto.

La Figura 60A reveló que en la holoenzima hay un residuo de triptófano que se oxida rápidamente sin afección de la actividad enzimática. No obstante, la modificación posterior de la enzima se acompaña de una rápida y total pérdida de actividad.

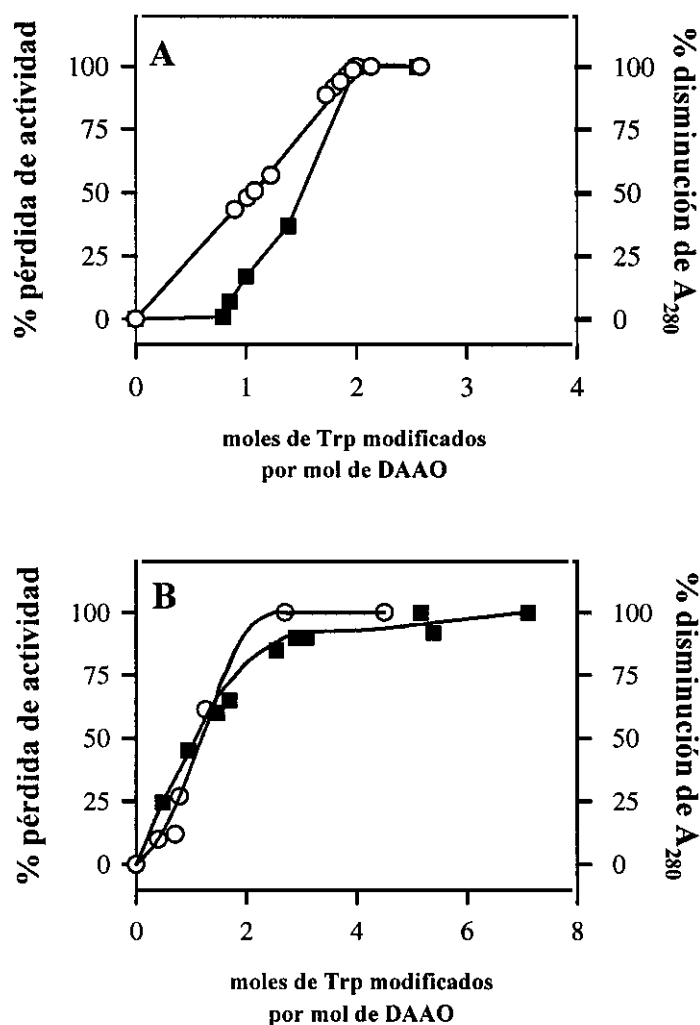


Figura 60. Correlación de la actividad DAAO con la extensión de la modificación de triptófanos. Muestras 7.2 μM de holoenzima (A) y apoproteína (B) se trataron con cantidades crecientes de NBS y los decrementos relativos de A_{280} (○), así como de actividad (■) se representaron frente a la modificación fraccional de triptófanos.

Otro modo de detectar la modificación de Trp de las proteínas consiste en registrar el espectro de fluorescencia de las proteínas tratadas frente a las no tratadas. Se registraron los espectros de fluorescencia de la apoenzima y la holoenzima tratadas con NBS y sin tratar y el resultado fue el que se muestra en la Figura 61.

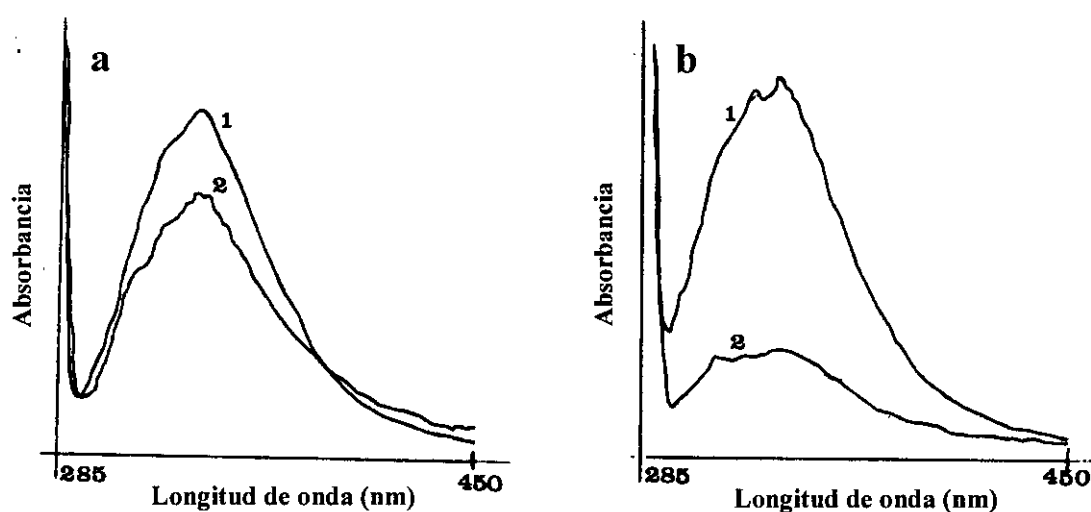


Figura 61. Espectros de emisión de fluorescencia antes y después de la modificación con NBS. Usando una longitud de onda de excitación de 280 nm, se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de muestras de apoproteína (a) y holoenzima (b), antes (1) y después (2) del tratamiento con NBS. La amplificación de la señal fue de 10 en todos los casos, excepto en el de la apoproteína sin tratar, que fue de 3 para evitar la saturación del aparato.

Como se puede observar en los espectros de fluorescencia, la emisión de fluorescencia de los triptófanos de la D-aminoácido oxidasa se ve, en ambas formas, afectada por la modificación, produciéndose una disminución de la intensidad de esta emisión. Tras excitación a 280 nm se observaron pérdidas de intensidad de fluorescencia a 335 nm de un 90 % y un 75 % tras la oxidación de cuatro y dos residuos de triptófano respectivamente en la apoenzima y la holoenzima. El cambio conformacional que ocurre cuando la enzima une FAD y dimeriza (Pollegioni y col., 1995) podría ser responsable del encubrimiento de algunos triptófanos evitando su contacto con el modificador en la holoenzima.

El máximo a 335 nm es típico de la emisión del triptófano en proteínas, lo que indica que la fluorescencia se debe sólo a residuos de triptófano expuestos en la superficie de la proteína (Basu y col., 1988). Por otra parte, los cambios en la intensidad de fluorescencia se correlacionaron con los observados en la absorción, lo que indica que ambos están vinculados y son dos facetas de una misma reacción (Ohnishi y col., 1980).

La presencia de grupos tiol libres en las proteínas puede interferir la titulación de triptófanos con NBS (Freishaim y Huennekens, 1969). El consumo de NBS en caso de existir tal interferencia es de varios moles (más de 5) antes de que se empiece a observar una disminución en la absorbancia a 280 nm. En nuestro caso, como ya se ha dicho, la inactivación total de la enzima se alcanzó tras un consumo de 1.5 moles de NBS por mol de enzima. No obstante, dado que la DAAO de *Rhodotorula gracilis* contiene 6 cisteínas por monómero, se decidió investigar la posibilidad de que la inactivación se debiera a la oxidación de cisteínas. La titulación de la enzima tratada con NBS (3 moles NBS por mol de enzima) con el reactivo de Ellman permitió la detección de 6 cisteínas por monómero, lo que indica que los grupos sulfhidrilo de la DAAO permanecen intactos durante la reacción con NBS.

El número de residuos esenciales de triptófano puede calcularse, como en el caso de la modificación de histidinas (3.4.2.1), por el método estadístico de Tsou (1962).

En el caso de la holoenzima los datos se ajustaron a la ecuación:

$$a^{1/i} = \frac{p + s - m}{p} \quad (43)$$

donde s es el número de triptófanos de la proteína que reaccionan más rápidamente y que no son esenciales para la actividad, p es el número de triptófanos que reaccionan más lentamente, de los cuáles i son esenciales para la actividad enzimática y m es el número de triptófanos modificados por molécula.

Representando $a^{1/i}$ frente a m se obtiene una recta cuya pendiente es $-1/p$ y s se calcula a partir de la ordenada en el origen. Como se observa en la Figura 62, el mejor ajuste a una recta se obtiene con valores de $s=1$, $p=1$ e $i=1$.

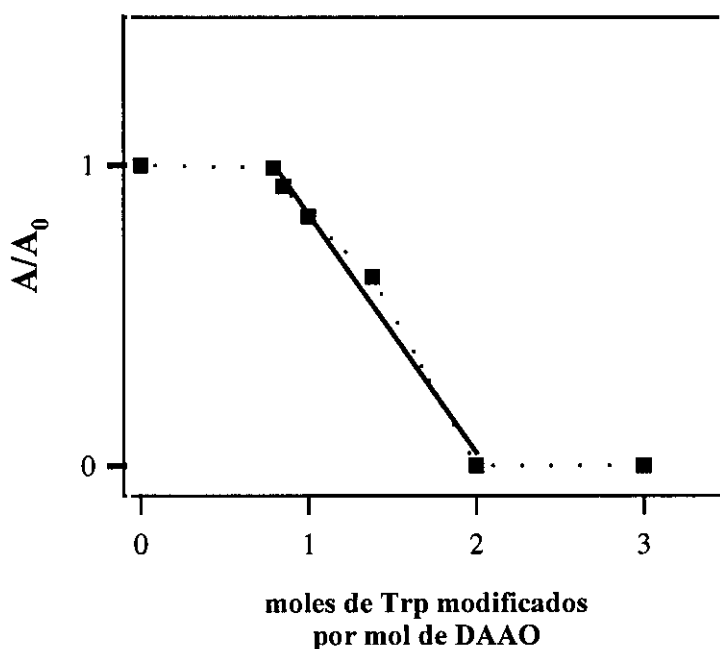


Figura 62. Actividad residual de DAAO frente al número de residuos de triptófano oxidados. El mejor ajuste a una recta se obtuvo por el método estadístico de Tsou con valores de $s=1$, $p=1$ e $i=1$.

En el caso de la apoenzima (Figura 63) también son dos los residuos de triptófano cuya modificación es necesaria para la completa inactivación según la extrapolación a actividad cero. Pero en este caso el cálculo del número de residuos esenciales mediante el análisis estadístico de Tsou se llevó a cabo por ajuste a la ecuación 42 que ya se utilizó para el cálculo del número de histidinas esenciales

(pág.107 de 'Resultados'). En este caso el mejor ajuste a una recta se obtuvo cuando $n=4$, $p=1$ e $i=1$ ($r=0.97$) (Figura 63B). El valor de α fue 0.179, lo que indica que el triptófano esencial reacciona 5.58 veces más rápido que el grupo de triptófanos de reacción "lenta".

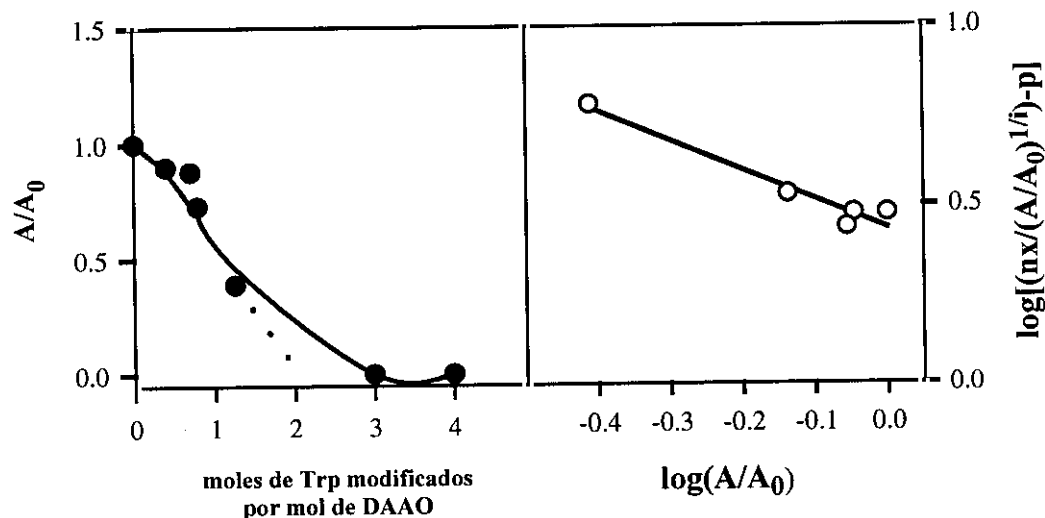


Figura 63. Actividad residual de DAAO frente al número de residuos de triptófano oxidados (A) y gráfico de Tsou correspondiente (B). Los puntos representados corresponden a valores experimentales, mientras que la recta se calculó usando la ecuación de Tsou con valores de $n=4$, $p=1$ e $i=1$.

Estos resultados indican que sólo un residuo de triptófano es esencial para la actividad en ambas formas (apo- y holo-) de la DAAO.

5.2.3.3. Estudios de protección

La protección frente a la inactivación por NBS se consiguió preincubando la enzima con benzoato, un inhibidor competitivo de la enzima (Curti y col., 1992), o con sustratos como la D-alanina o la cefalosporina C (Figura 64). Todos estos compuestos produjeron una protección completa de la enzima frente a la inactivación, lo que indica que el residuo esencial de triptófano está en (o cerca de) el centro activo de la enzima.

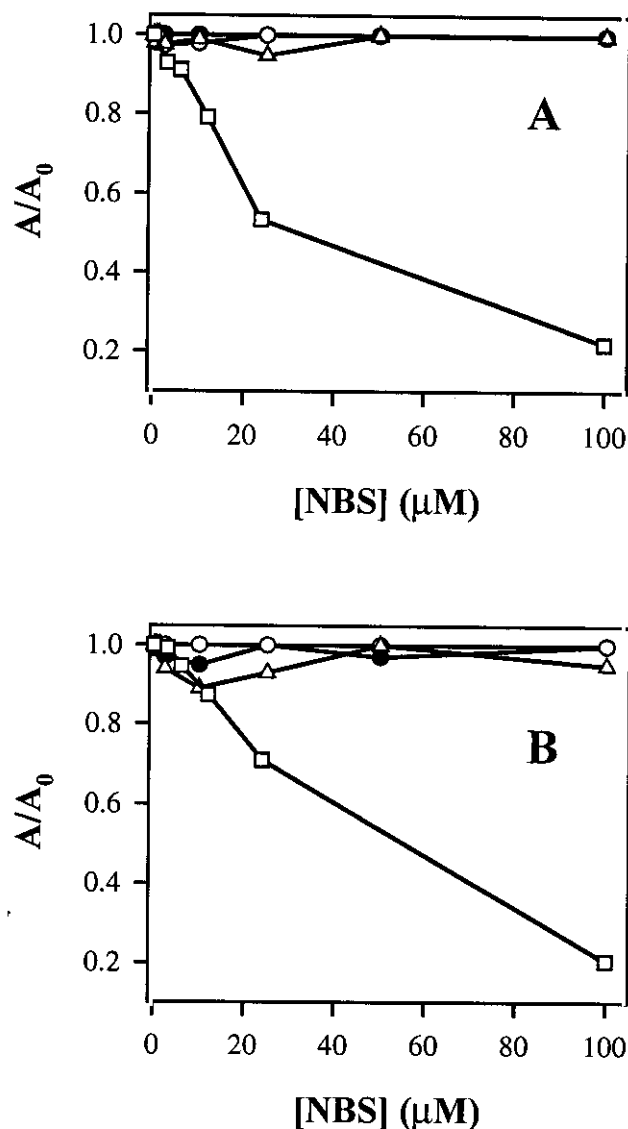


Figura 64. Protección de DAAO frente a la inactivación por NBS. Muestras de apoproteína (A) y holoenzima (B) fueron preincubadas con D-Ala 10 mM (●), Cef C 20 mM (○), benzoato 10 mM (△) o agua (□) antes de ser tratadas con NBS. Los controles de actividad enzimática se prepararon en idénticas condiciones pero en ausencia de NBS.

5.2.3.4. Estudios de la integridad y la dimerización de la DAAO modificada

La reacción de NBS con proteínas puede, en determinadas condiciones, conducir a la rotura del enlace peptídico a nivel de triptófanos, tirosinas e histidinas (Spande y Witkop, 1970). No obstante las condiciones óptimas para que tenga lugar la rotura del enlace peptídico son de pH 4 (resultando despreciable por encima de pH 5.5), elevadas concentraciones del reactivo y tiempos largos de incubación. Sin embargo, con bajas concentraciones de NBS y pH próximo a la neutralidad, el reactivo modifica selectivamente triptófanos, sin rotura de la cadena polipeptídica. Se pudo comprobar mediante electroforesis con SDS y filtración en gel que la DAAO modificada con NBS en nuestras condiciones de ensayo mantenía su integridad a nivel de su estructura

primaria. La enzima (en sus formas apo- y holo-) tratada con NBS migró como una única banda en SDS-PAGE y su peso molecular aparente era idéntico al de la enzima no tratada. En cromatografía de filtración en gel se obtuvo un único pico simétrico (Figura 65), pudiéndose asumir, por tanto, que la inhibición de la actividad en presencia de este reactivo es debida a la modificación de triptófanos esenciales para el mantenimiento de la conformación activa, la catálisis y/o la unión de sustrato.

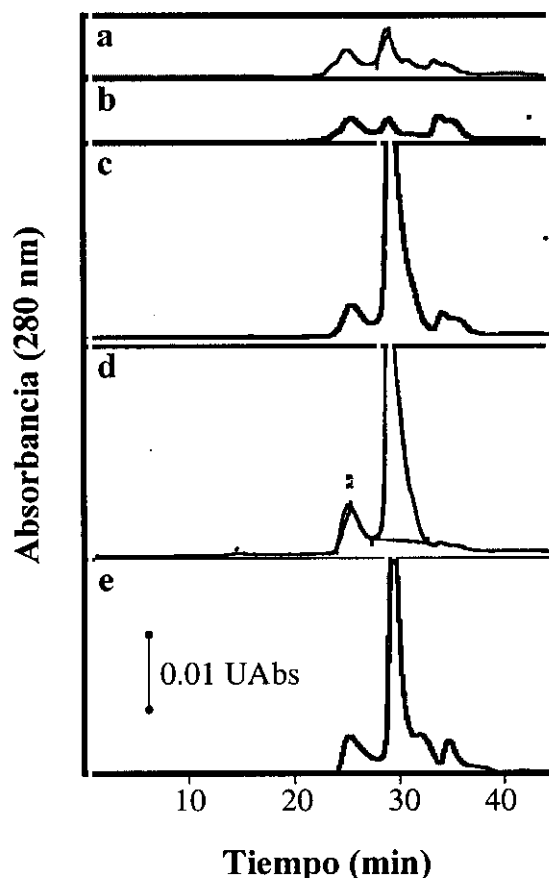


Figura 65. Análisis por HPLC de la oligomerización de DAOO tras modificación con NBS. Se muestran los cromatogramas de apoproteína control (a), tratada con NBS (b) y reconstituida tras modificación (c), así como de holoenzima control (d) y modificada (e). La escala de ordenadas se muestra en unidades de absorbancia (UAbs)

Por otro lado, el análisis por HPLC de soluciones de apoproteína y holoenzima tras el tratamiento con NBS (y reconstitución con FAD en el caso de la apoproteína) (Figura 65) permitió descartar la implicación de los residuos modificados en el interfaz de unión entre monómeros al obtenerse idénticos equilibrios monómero/dímero en las muestras tratadas y las no tratadas

La apoenzima tratada con NBS une el FAD con una afinidad ($K_D=8.5 \cdot 10^{-9}$) casi idéntica a la exhibida por la proteína no tratada ($K_D=9.2 \cdot 10^{-9}$). La electroforesis en condiciones nativas y los estudios de filtración en gel mostraron que la apoproteína tratada con NBS y reconstituida con FAD dimeriza de igual forma que la proteína no tratada (Casalin y col., 1991). Todos estos resultados indican que el triptófano esencial no está implicado en la unión de FAD ni en la dimerización.

5.2.4. Modificación de otros residuos de DAAO

También se llevaron a cabo experimentos para la modificación específica de argininas, lisinas, cisteínas y serinas de la DAAO.

La DAAO perdió actividad tras incubación a 25°C durante 30 minutos con diferentes concentraciones de fenilglioxal (Figura 66). Este resultado se vio corroborado posteriormente con la publicación (Gadda y col., 1994b) de la probable existencia de una arginina esencial en la enzima. Este residuo, Arg²⁸⁵, está conservado en todas las oxidasas comparadas en el presente estudio (Arg²⁸³ en la DAAO de riñón de cerdo) y es probablemente la pareja iónica del carboxilo del sustrato, o bien interacciona con el sitio N1-C2=O de la flavina.

La incubación con TNBS condujo también (Figura 66) a la nactivación de la DAAO y, de igual forma, otro grupo investigador (Gadda y col., 1994a) informó de la esencialidad de algún residuo de lisina en la DAAO de *Rhodotorula gracilis*.

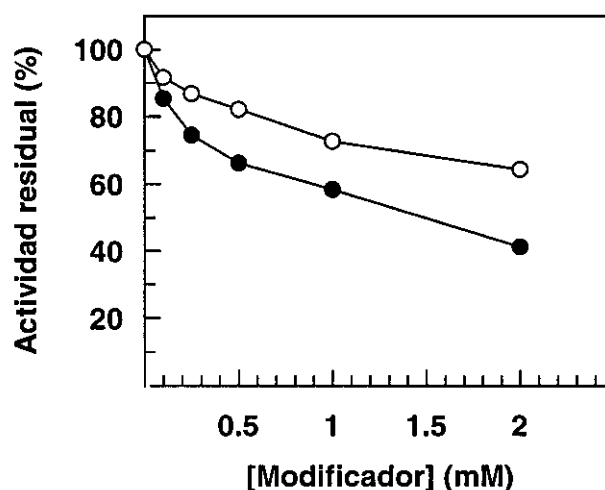


Figura 66. Inactivación por modificación de argininas y lisinas de la DAAO. La actividad residual se representa tras 30 minutos de incubación a 25°C y pH 7.5 con diferentes concentraciones de fenilglioxal (○) o TNBS (●).

Hay 6 cisteínas en la secuencia de la DAAO, ninguna de las cuáles participa en el establecimiento de puentes disulfuro intra- o intercatenarios. El tratamiento de la enzima con el reactivo de cisteínas PHMB condujo a la inactivación de la misma (Figura 67), destruyéndose el 80% de la actividad total durante 30 minutos de incubación a 25°C con 2 mM PHMB.

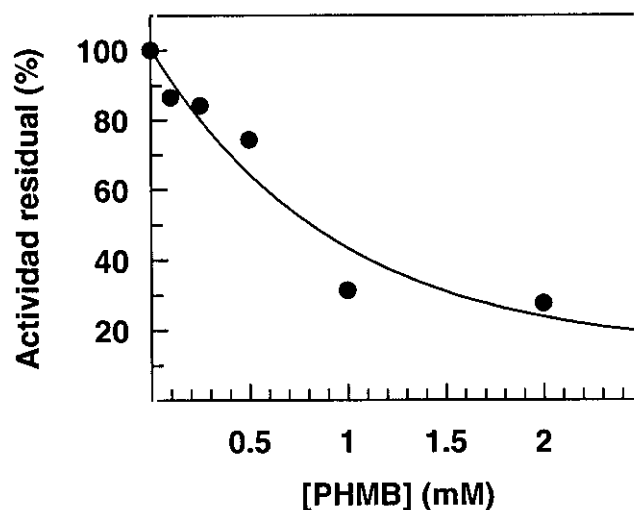


Figura 67. Inactivación de la DAAO por PHMB. Se representa la actividad residual tras 30 minutos de incubación a 25°C y pH 8.8 con diferentes concentraciones del reactivo.

Posteriormente se ha postulado (Pollegioni y col., 1997) la presencia de un residuo de cisteína en el sitio de unión del FAD al observar la unión covalente del análogo de flavina 8-(metilsulfonil)-FAD a través de un tiol de la enzima.

La reacción de la DAAO con PMSF no conduce a la pérdida de actividad. Muestras de 2.5 μ g de DAAO fueron tratadas con varias concentraciones (hasta 10 mM) del modificador durante 30 minutos a 25°C y pH 7.5 sin observarse alteración de la actividad enzimática en ningún caso.

APÉNDICE

Figura A1. Modelo en estructura química de la secuencia de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*. Los residuos para los que se ha propuesto un papel en la reacción de la DAAO de riñón de cerdo y están conservados en varias oxidasas aparecen en rojo. En azul se muestran los residuos incluidos en motivos consenso detectados en esta proteína.

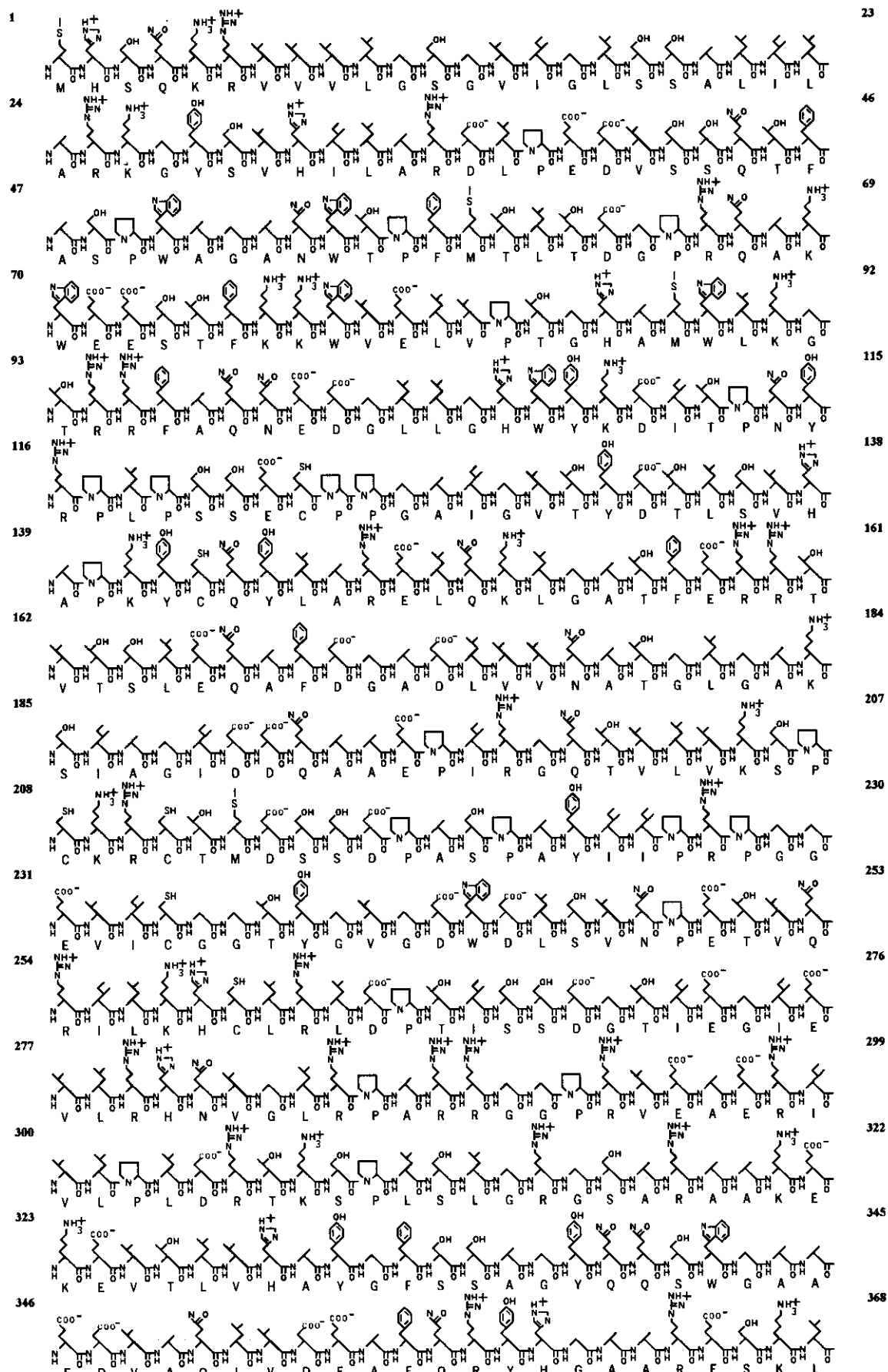


Figura A2. Modelo en relleno espacial de la secuencia de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*. Los residuos están coloreados según sean ácidos (rojo), básicos (azul oscuro), polares no cargados (azul) o hidrofóbicos (verde oliva). Las histidinas se muestran en granate, las metioninas en verde azulado, las prolina en fucsia y las glicinas en negro.

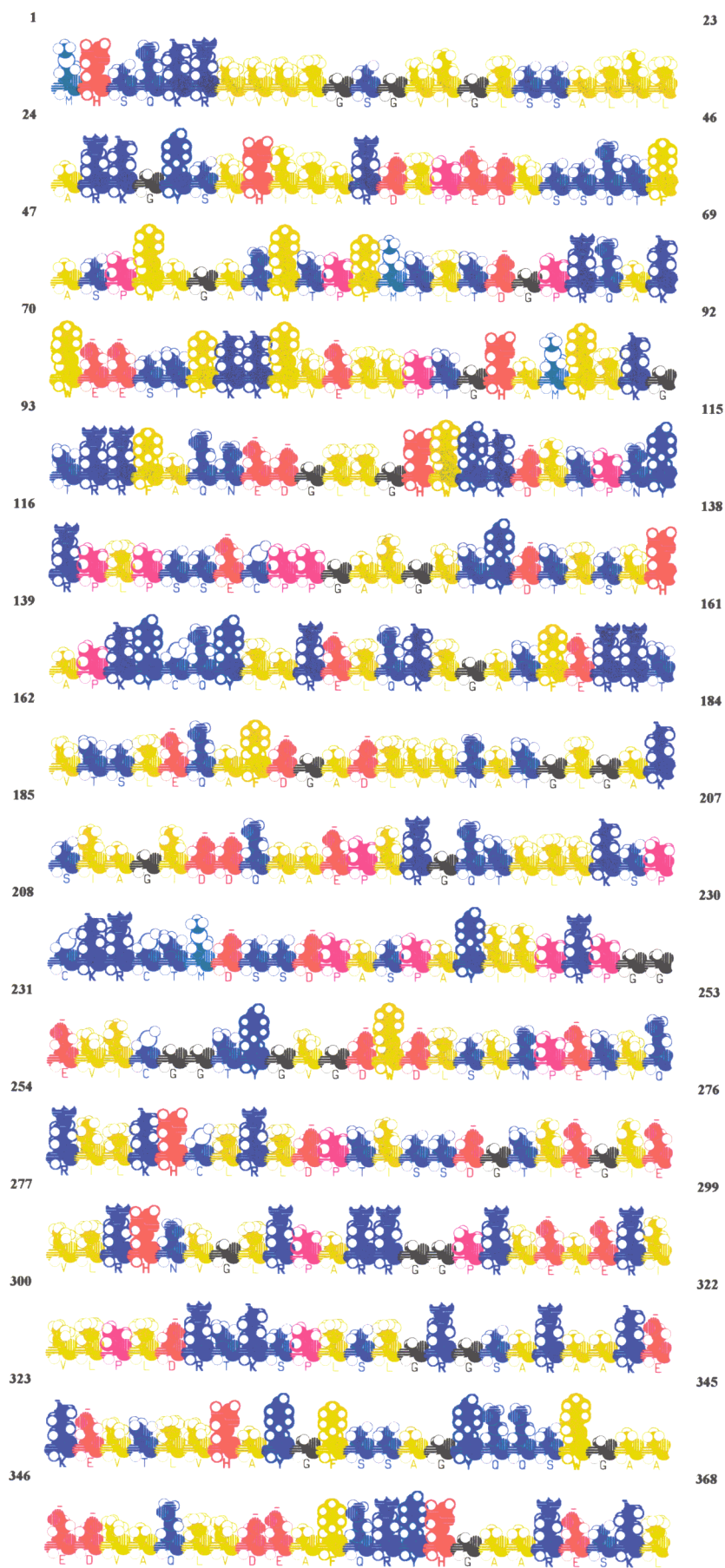


Figura A3. Predicciones de estructura secundaria de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*. Se representan gráficamente los resultados del análisis de la secuencia de aminoácidos por diferentes métodos.

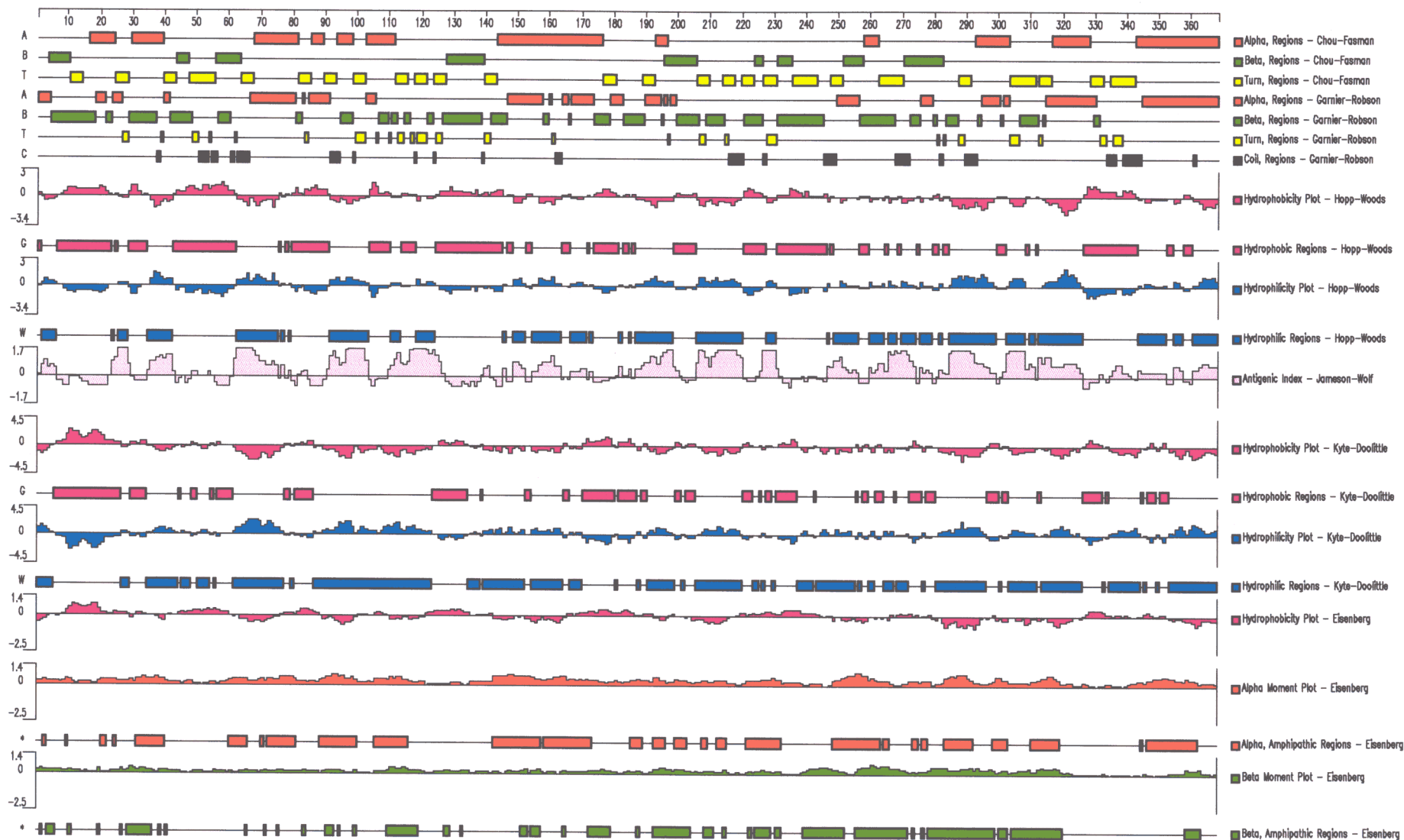
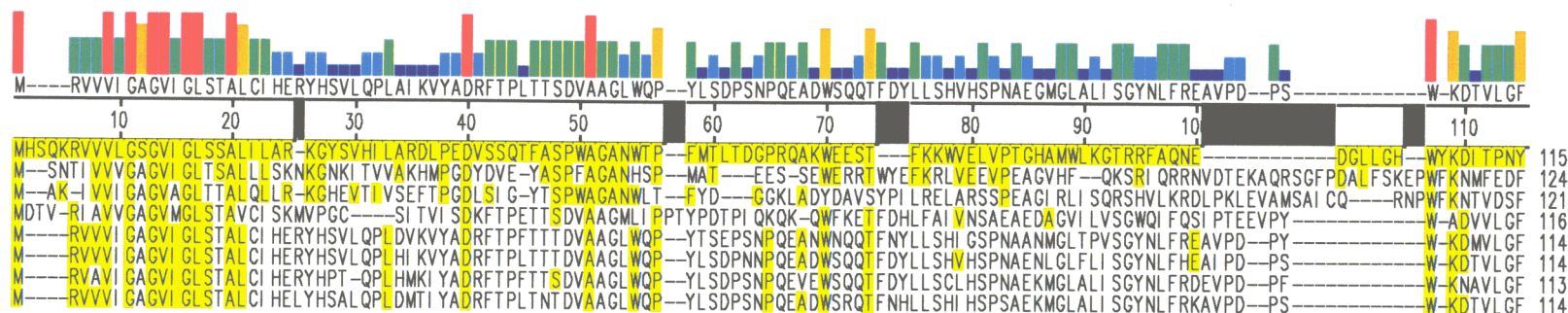
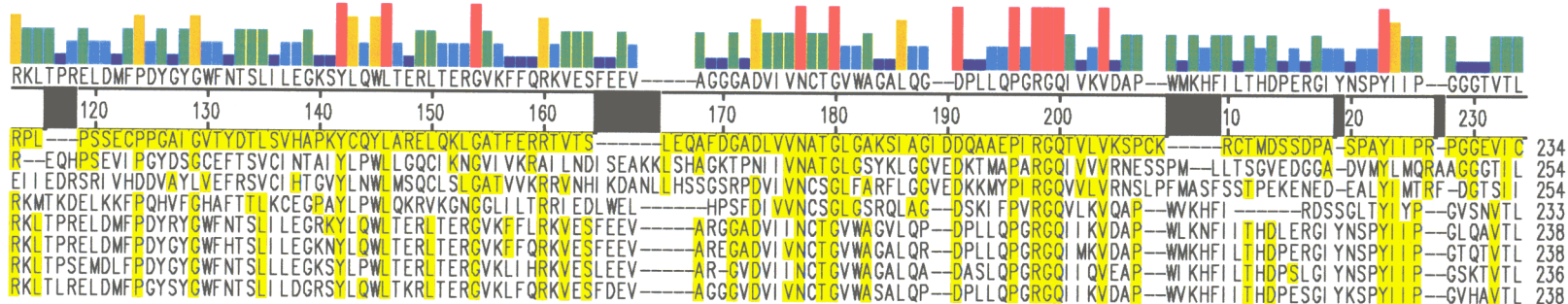


Figura A4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la DAAO de *Rhodotorula gracilis* con las de otras oxidasas. Las D-aminoácido oxidasas de *Rhodotorula gracilis* (DAORG), *Fusarium solani* (DAOFS), *Trigonopsis variabilis* (DAOTV), *Sus scrofa* (DAOSS), *Homo sapiens* (DAOHS), *Mus musculus* (DAOMM) y *Oryctolagus cuniculus* (DAOOC), y la D-aspartato oxidasa de *Bos taurus* (DDOBT) fueron alineadas usando el programa MegAlign (DNASar Inc., EEUU) usando el método CLUSTAL V y la tabla de ponderación de residuos PAM250. La escala numérica refleja las posiciones en la secuencia DAORG y el histograma refleja el mayor consenso en cada posición por la altura de las barras y su color (rojo:8; naranja:7; verde:6; azul claro:5 y azul oscuro:3). Sombreados en amarillo aparecen los residuos coincidentes con los correspondientes a la secuencia DAORG.

Mayoría {



Mayoría {



Mayoría {

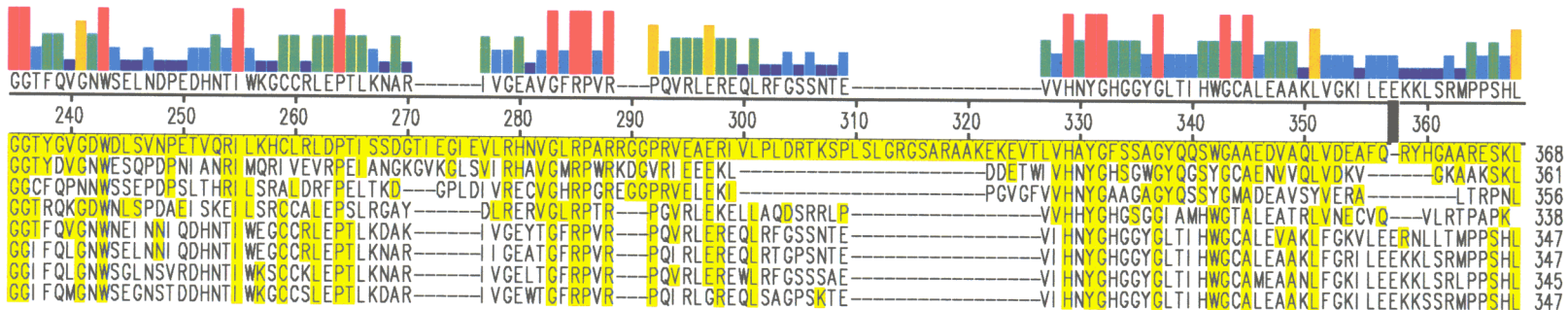


Figura A5. Modelo tridimensional de un fragmento de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*. Sobre la base de la estructura resuelta por difracción de Rayos X del complejo de la DAAO de riñón de cerdo con benzoato, el programa SwissModel construyó el modelo tridimensional de la región Lys⁵-Thr²⁷⁵ de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*. En cada figura se muestra el esqueleto de la cadena polipeptídica y las cadenas laterales de los residuos relevantes en cada caso:

A: dominios funcionales

- de interacción entre monómeros (rojo)
- de unión de FAD (amarillo)
- residuo amino-terminal (gris claro)
- residuo carboxilo-terminal (verde)

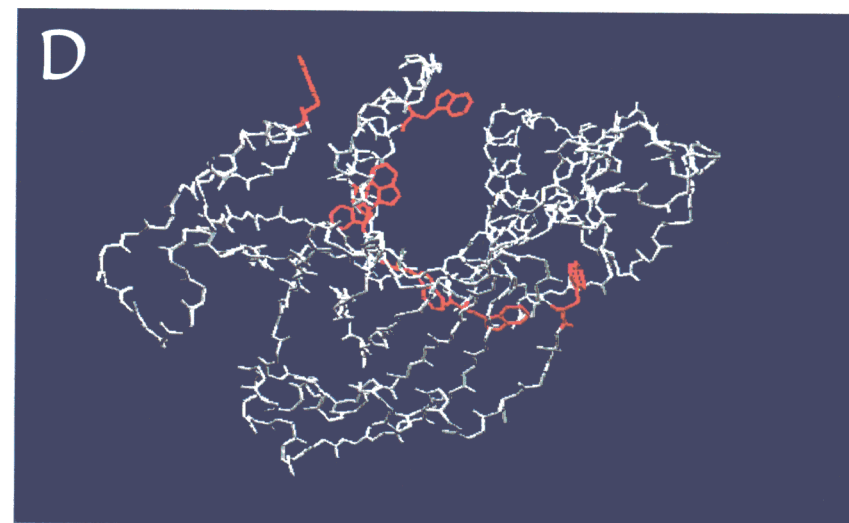
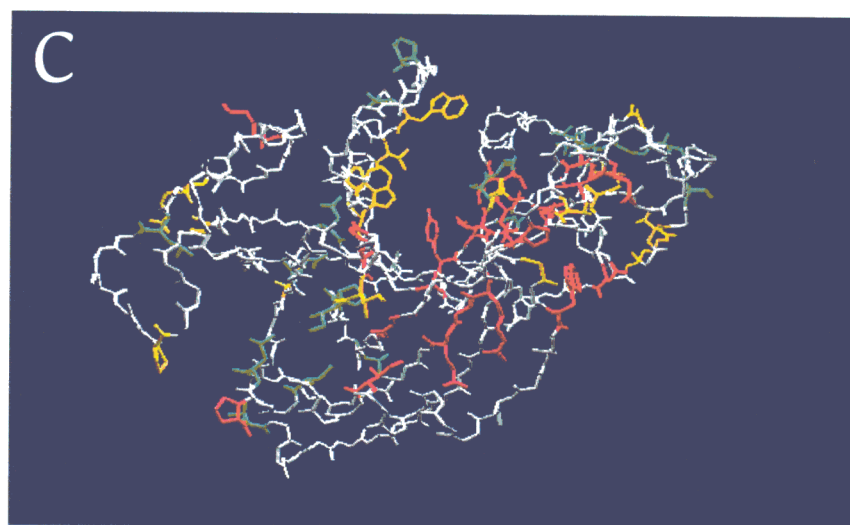
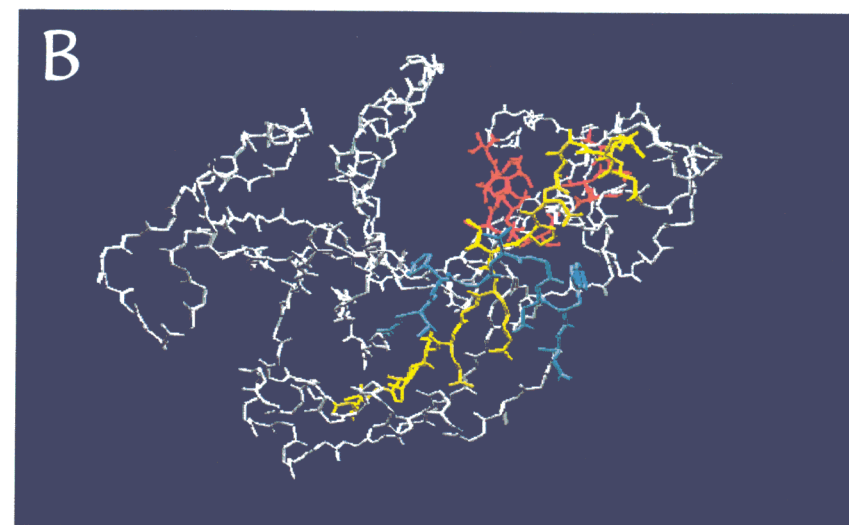
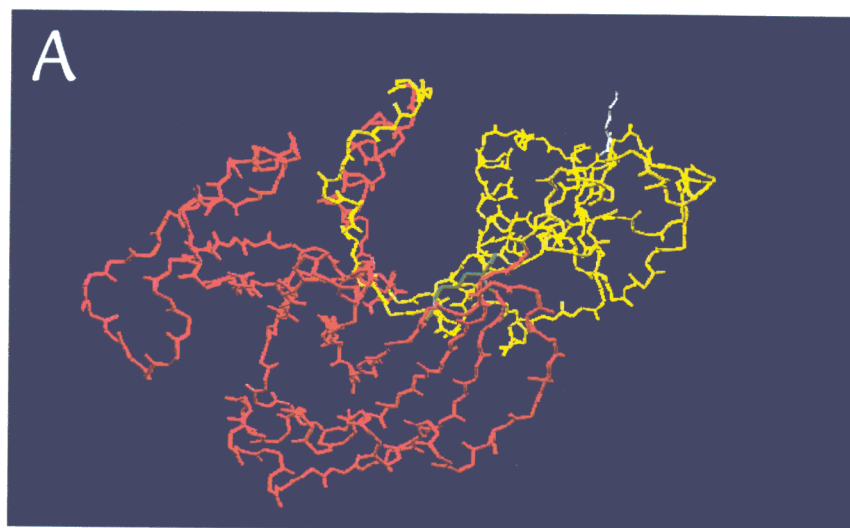
B: regiones conservadas

- de unión de la mitad adenínica del FAD (rojo)
- que contiene el Asp191 (amarillo)
- de unión de la mitad flavínica del FAD (azul)

C: residuos conservados

- en las 7 DAAO's (rojo)
- en 6 de las 7 DAAO's, la de *R.gracilis* entre ellas (amarillo)
- en 5 de las 7 DAAO's, la de *R.gracilis* entre ellas (verde)

D: triptófanos (rojo)



DISCUSIÓN

1. PURIFICACIÓN Y PROPIEDADES MOLECULARES DE DAAO

El procedimiento de purificación establecido en este trabajo experimental permite la obtención de DAAO electroforéticamente pura con un cociente A_{274}/A_{455} de 8 como se ha descrito para preparaciones puras de DAAO de *Rhodotorula gracilis*. La mejora de la estabilidad de la enzima ha sido crucial para el éxito del procedimiento de purificación y son el glicerol y el FAD los principales estabilizadores detectados.

El glicerol ha sido descrito (Raibekas y Massey, 1997) como una chaperona química capaz de inducir el plegamiento correcto de la DAAO de riñón de cerdo tras la sustitución por mutagénesis dirigida de la His³⁰⁷ por una leucina. El mutante H307L muestra una afinidad drásticamente disminuida por el FAD y una mayor vulnerabilidad a la digestión por proteasas con respecto a la proteína salvaje. La resolución de la estructura cristalina de la enzima demostró (Mizutani y col., 1996; Mattevi y col., 1996) que este residuo, aunque situado en el dominio de unión de flavina, no está orientado suficientemente cerca del FAD. La recuperación de la afinidad por FAD de la proteína mutante en presencia de glicerol, compuesto que fortalece las interacciones hidrofóbicas internas de la proteína, ha llevado a la conclusión de que el papel de la His³⁰⁷ puede ser el mantenimiento de una conformación adecuada del dominio de unión de la flavina. Cabe esperar que el FAD favorezca el mantenimiento de tal conformación resistente al ataque de proteasas mientras se encuentra unido y, de hecho, aunque la enzima de *Rhodotorula gracilis* une el FAD con mayor fuerza que la de cerdo, el marcado efecto estabilizador del FAD exógeno en preparaciones impuras de esta enzima ha quedado demostrado a lo largo del presente trabajo experimental.

La elevada proporción de residuos hidrofóbicos en la secuencia de la enzima puede explicar la dificultad de su adsorción a resinas de intercambio iónico pero posibilita el uso de las de interacciones hidrofóbicas como la Phenyl-Sepharose CL-4B con una elevada eficacia en la purificación. La elevada afinidad por el FAD, por otro lado, permite la adsorción de la apoproteína a resinas con grupos funcionales que imitan al cofactor, típicamente usadas en procedimientos de aislamiento de flavoproteínas como el Cibacron Blue.

Si bien cabe esperar un comportamiento similar de la DAAO obtenida de su fuente natural y de un clon de *E.coli* que la hiperexpresa en los diferentes pasos cromatográficos, las diferencias de composición de los extractos de partida en uno y otro casos justifican el uso de diferentes protocolos de purificación. De hecho, la purificación de DAAO clonada por el método descrito para la extraída de *Rhodotorula gracilis* no resultó exitosa.

El peso molecular obtenido por SDS-PAGE fue de 37.5 kDa, valor algo más bajo que el calculado más tarde sobre la base de la secuencia de aminoácidos (40 kDa). Por filtración en gel, pudo calcularse un peso molecular de 80.3 kDa para la forma activa de DAAO, es decir, el dímero con una molécula de FAD por monómero.

La enzima pura muestra el espectro típico de flavoproteínas con máximos a 274, 378 y 455 nm. En el espectro de la apoproteína están ausentes los dos máximos de la región visible. El espectro de emisión de fluorescencia de la DAAO es el característico

de triptófano con un máximo de emisión a 335 nm tras excitación a 280 nm. Al comparar los espectros de la apoproteína y la holoenzima se detectan dos diferencias fundamentales: la intensidad de la emisión disminuye drásticamente en la holoenzima por el apantallamiento ejercido por el FAD y aparece un máximo secundario a 325 nm posiblemente por pasar algun(os) residuos de triptófano a un microentorno más apolar (Lakowicz, 1998; García-Segura, 1998).

La cinética de unión del FAD a la apoproteína muestra dos fases. La primera se caracteriza por una gran disminución en la fluorescencia flavínica y una ligera disminución de la emisión de la proteína y la segunda presenta una lenta disminución adicional de la fluorescencia del FAD y un marcado apantallamiento de la emisión proteica. Al comparar la cinética de disminución de la fluorescencia flavínica con la de actividad enzimática, se pudo asignar la aparición de actividad a la segunda fase detectada en el estudio de espectroscopía de fluorescencia. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que la unión del FAD (rápida) es requisito previo para la dimerización (lenta) y/o por la existencia de cambios conformacionales en la apoproteína y/o la flavina posteriores a la asociación e imprescindibles para la aparición de actividad enzimática.

Los espectros de dicroísmo circular de las formas apo y holo de la DAAO muestran una presencia relativamente escasa de estructura secundaria en α -hélice en ambas formas y no permiten la extracción de información relativa a la abundancia de lámina β . La mayor presencia de hélice α en la apoproteína (25%) que en la holoenzima (15%) corrobora la existencia de cambios conformacionales en la proteína durante el proceso de reconstitución de holoenzima. Estos reajustes de la estructura tridimensional de la proteína son sustanciales pues modifican significativamente la estructura secundaria.

La constante de disociación del complejo FAD/apoproteína fue determinada aprovechando la capacidad de la apoproteína para apantallar la fluorescencia flavínica. El valor obtenido ($0.90 \cdot 10^{-8}$ M) es más bajo que el descrito para la enzima de riñón de cerdo ($2.2 \cdot 10^{-7}$ M) (Massey y Curti, 1966). De hecho, las preparaciones obtenidas a partir de células de *Rhodotorula gracilis* no requieren la adición de FAD exógeno en los ensayos de actividad. Esta característica reviste una gran importancia desde el punto de vista industrial y supone una ventaja adicional respecto a la enzima de mamífero.

Todos los estudios de las propiedades moleculares de DAAO han sido llevados a cabo tanto con la enzima extraída de su fuente natural, como con la clonada en células de *Escherichia coli*. En ningún caso se han detectado diferencias significativas entre las enzimas de ambas fuentes.

2. EFECTO DEL H₂O₂ SOBRE LA DAAO

La localización de la DAAO en peroxisomas se ha relacionado con la producción de H₂O₂ durante la reacción que esta enzima cataliza. La presencia de catalasa en estos orgánulos debe evitar la inactivación que se observa *in vitro* de la enzima por este potente agente oxidante. Como en los peroxisomas, la DAAO debe protegerse del efecto del H₂O₂ en los bioreactores industriales de producción de 7-ACA

y el estudio del modo de oxidación de la enzima resulta interesante pues podría contribuir a la identificación de métodos de estabilización de la DAAO.

El H_2O_2 es un potente oxidante de diversos compuestos orgánicos. En proteínas ataca principalmente a los residuos con azufre metionina y cisteína. En presencia de determinados iones metálicos, ácidos orgánicos o éteres, puede atacar también a cistinas, triptófanos o tirosinas. De hecho, controlando las condiciones de oxidación, se ha usado el H_2O_2 como modificador específico de metioninas en proteínas sin contenido tiólico (Neumann, 1972). Mientras que la oxidación de metioninas se favorece a valores bajos de pH, la de cisteínas es más lenta en dichas condiciones.

En el presente estudio, la titulación de metioninas con ácido iodo- $[^{14}C]$ -acético antes y después del tratamiento de las formas apo y holo de la DAAO, permitió descartar este tipo de residuo como responsable de la inactivación observada. Esta inactivación es mucho más rápida en la apoproteína que en la holoenzima, lo que implicaría una mayor extensión de la oxidación en la primera. La incorporación de iodoacetato resultó idéntica por las dos formas de DAAO, en correspondencia con el número total de metioninas por monómero. Esto significa que en las condiciones de oxidación seleccionadas (H_2O_2 10-50 mM, 30°C, pH 8.0) no se oxida ninguna de las metioninas presentes en la estructura de la DAAO.

La titulación con DTNB de residuos de cisteína antes y después de tratar con H_2O_2 muestras de apoproteína y holoenzima permitió determinar que en ambos casos se oxida uno de los 6 residuos de cisteína presentes por monómero. La igual susceptibilidad de las formas apo y holo a la oxidación de este tiol permite descartarlo como responsable de la inactivación observada, frente a la cuál la holoenzima es significativamente más resistente. No obstante, no se puede descartar que el tiol oxidado sea diferente para ambas formas de enzima.

Los residuos de triptófano se oxidan típicamente a pH 8.0-10.0 (Hachimori, 1964), condiciones óptimas también para la reacción de la DAAO. La oxidación de triptófanos puede seguirse espectrofotométricamente y así distinguirse también de la de tirosinas. Los resultados de los estudios de modificación de la DAAO con NBS apuntaban claramente a la existencia de triptófanos esenciales y este hecho reforzó la hipótesis de que el tipo de residuo responsable de la inactivación por H_2O_2 fuera el de triptófano.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental apuntan a la implicación de el (los) triptófano (s) oxidados por H_2O_2 en la dimerización de la DAAO. De hecho, la unión de FAD no se afecta por esta oxidación pero el equilibrio monómero-dímero sí que se desplaza hacia la forma monomérica cuando la proteína es tratada con este agente oxidante. Este resultado indica que los triptófanos responsables de la inactivación por H_2O_2 no coinciden con los oxidados por NBS ya que en el primer caso se afectó la dimerización mientras que en el segundo no.

3. MECANISMO QUIMICO

3.1. Estudios de pH

Las representaciones de $\log V_{\max}/K_M$ y $\log V_{\max}$ mostraron inflexiones tanto a valores altos como bajos de pH. La de la zona de bajo pH corresponde a un valor de pK de 6.26 en el perfil de V_{\max} y 7.95 en el de V_{\max}/K_M . Consecuentemente, un grupo de la enzima o del sustrato debe estar desprotonado para que haya actividad. Dado que el sustrato no posee ningún grupo ionizable con este valor de pK , se deduce que un grupo de la enzima es esencial para la actividad y responsable de la inflexión observada. Los resultados de los estudios de perturbación por disolventes indicaron que este grupo es de tipo ácido catiónico. Sin embargo, la ΔH_{ion} correspondiente apunta hacia un ácido neutro. Hay dos residuos de aspártico conservados en todas las DAAO's, a saber Asp⁴⁰ y Asp¹⁹¹ (Faottoy col., 1995). En la glicolato oxidasa, otra flavoprotein oxidasa, se ha propuesto que un residuo de aspártico juega un papel en el mecanismo catalítico de la enzima formando parte de un relé de carga que implica también a la histidina responsable de la abstracción del protón del sustrato (Lindqvist, 1992). Recientemente (Ramon y col., 1995), hemos demostrado la existencia de una histidina esencial en el centro activo de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*; resulta entonces posible postular que uno de los dos residuos de aspártico conservados forme parte de un relé de carga similar al propuesto para la glicolato oxidasa. Los resultados de estudios de perturbación con disolvente presentados aquí indicaron que un grupo catiónico era responsable del pK_1 , aunque la ΔH_{ion} del grupo apuntaba hacia un residuo carboxílico. Es posible que el pK molecular observado sea el resultado de las contribuciones de varios grupos de distintos tipos. En este sentido, en el sistema carboxilato-imidazol de la quimotripsina, el protón se añade por la cara de la histidina que resulta accesible al agua y la carga neta del complejo es la de un ácido neutro. De esta forma, las pruebas con disolventes orgánicos apuntan a un ácido catiónico, mientras que el valor de ΔH_{ion} corresponde a un residuo carboxílico (Koepe y Stroud, 1976; Hunkapiller y col., 1973). La diferencia observada entre los valores de ΔH_{ion} extraídos de los perfiles de V_{\max} y V_{\max}/K_M puede ser atribuida a la solvatación del grupo ácido. Cuando se forma el complejo ES, se reduce la solvatación del residuo carboxílico, aumentando la ΔH_{ion} del grupo con respecto al valor observado en el perfil de V_{\max}/K_M , el cuál corresponde al grupo con una mayor accesibilidad al disolvente en la enzima libre (Parsons y Raferty, 1972).

Cuando comparamos el perfil de V_{\max}/K_M con el de pK_i , parece evidente que el pK_1 observado en el perfil de V_{\max}/K_M refleja la ionización de un grupo responsable de la catálisis. No hay vestigios de un pK de 6.5-8 en el perfil de pK_i y por tanto el estado de protonación de este grupo no es importante para la unión del sustrato. Esto resulta en cierto modo sorprendente, ya que este grupo parece estar implicado en la abstracción del protón del sustrato y, por ello, cabe esperar que tenga algún efecto en la unión del mismo. Es posible que el D-aspartato, usado en los experimentos de variación con el pH de la K_i de un inhibidor competitivo, no se una exactamente de la misma manera que la D-alanina.

El pK_1 extraído del perfil de V_{\max} se desplaza hacia valores más bajos de pH, cerca de 1.7 unidades de pH en relación con el valor observado en el perfil correspondiente a V_{\max}/K_M , que supuestamente representa el verdadero pK para la

enzima si tenemos en cuenta que la D-alanina no es un sustrato 'pegajoso' ('sticky') para la DAAO de *Rhodotorula gracilis* (Pollegioni y col., 1993). Este desplazamiento sugiere que la unión del sustrato favorece la liberación del correspondiente protón.

En cuanto a la identidad del grupo responsable del pK_2 , los resultados son más difíciles de interpretar y probablemente apuntan hacia el grupo amino del sustrato ya que no se observó ningún pK_2 en el perfil de V_{\max}/K_M cuando se introdujo la corrección para la ionización del sustrato en el ajuste de los datos experimentales. La adición de DMSO al 20% (v/v) produjo una disminución en la K_M , lo que hace pensar en una unión más fuerte del sustrato a la enzima y apoya la existencia de una interacción iónica entre ambas moléculas, explicando además el desplazamiento, hacia valores más altos, del pK_2 visto en el perfil de V_{\max} . No obstante, cuando una etapa lenta no dependiente del pH sucede a la reacción catalítica y es determinante de la velocidad (p.ej., la liberación del producto), los pK 's se desplazan hacia afuera en el perfil de V_{\max} hasta el punto en que la reacción catalítica se convierta en limitante de la velocidad. Este fenómeno no afecta al perfil de V_{\max}/K_M , que refleja sólo los pasos previos a la liberación del primer producto. Por esto, la liberación del producto (ácido pirúvico) como etapa limitante de la velocidad en presencia del disolvente, no puede descartarse. Dado que tanto la V_{\max} como V_{\max}/K_M disminuyen por encima de pK_2 , la D-alanina se une a la enzima tanto en su forma protonada como en la desprotonada, aunque la enzima prefiere unir la primera (Cleland, 1997). Los valores de ΔH_{ion} apuntan hacia un grupo amino pero los resultados de perturbación con disolventes no permitieron la identificación definitiva del grupo ionizable ya que el pK_2 de los perfiles de V_{\max}/K_M no cambia significativamente por adición de DMSO al 20% (v/v) en tampones ácido-neutros ni tampoco en tampones catiónicos. Este resultado podría ser consistente con el aumento de la eficacia catalítica en presencia de DMSO al 20% (v/v) a pH's básicos.

La unión de un inhibidor competitivo se impide cuando un grupo con un pK de 8.4 se desprotona. Como este valor de pK no corresponde al D-aspartato, debe representar un grupo de la enzima. Dado que este pK no se observa también en el perfil de V_{\max}/K_M , podría representar un grupo de la enzima implicado en la unión del grupo β -carboxilo del inhibidor. Actualmente se conoce la capacidad de DAAO's de diversas fuentes para unir una gran variedad de ácidos carboxílicos alifáticos y aromáticos (Fonda y Anderson, 1968). Los primeros trabajos (Dixon y Kleppe, 1965a) habían mostrado un pK_i alrededor de 8.6 para la enzima libre que apuntaba hacia un grupo básico al que el inhibidor se unía a través de su propio grupo carboxílico. Este grupo básico podría ser distinto al que interacciona con el grupo α -carboxílico del sustrato, cuya naturaleza no ha sido posible deducir de los estudios presentados aquí probablemente por estar su valor de pK fuera del intervalo de pH usado en nuestros experimentos.

3.2. Identificación de un residuo esencial de histidina

Los estudios de modificación química de la DAAO de riñón de cerdo permitieron la identificación de un residuo básico en el centro activo de la enzima probablemente implicado en la abstracción del protón α del sustrato para producir el correspondiente intermediario carbaniónico (Swenson y col., 1984; Walsh, 1979). Este residuo fue inicialmente identificado como la cadena lateral de imidazol de la His²¹⁷.

Sin embargo, estudios de mutagénesis dirigida del centro activo (Watanabe y col., 1988; Watanabe y col., 1989) mostraron que la sustitución de His²¹⁷ por Leu no afectaba significativamente la actividad catalítica. Por el contrario, la sustitución de His³⁰⁷ por Leu causó inactivación completa de la enzima. Más recientemente se ha obtenido evidencia de la esencialidad de residuos de histidina en la DAAO de *Trigonopsis variabilis*.

El DEP reacciona con nucleófilos en su estado desprotonado. A pH neutro, la reacción del DEP con proteínas es relativamente específica de residuos de histidina (Miles, 1977), pero en medios ligeramente alcalinos este reactivo puede también reaccionar con lisinas, tirosinas y cisteínas. No obstante, para la modificación de grupos imidazol con DEP se han descrito constantes de velocidad de segundo orden mayores que $0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, mientras que otros residuos reaccionan al menos 10 veces más lentamente (Holbrook y Ingram, 1973).

El análisis espectroscópico también permite distinguir la modificación de histidinas de la de otros residuos. El tratamiento de DAAO con DEP inactiva rápida y completamente la enzima. La inactivación siguió una cinética de pseudo-primer orden con una constante de velocidad de inactivación segundo orden de $0.245 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. La modificación de la enzima se acompaña de un incremento de absorbancia a 242 nm que es característico de *N*-carbetoxihistidil derivados. No se observaron cambios de absorbancia a 280 nm, lo que descarta la modificación de residuos de tirosina (Miles, 1977). Además, se encontró una buena correlación entre los cambios de absorbancia a 242 nm y la pérdida de actividad enzimática y la constante de velocidad de segundo orden calculada a partir del seguimiento temporal del aumento de absorbancia a 242 nm es casi idéntica a la obtenida de la cinética de inactivación. La velocidad de inactivación depende de un pK_a de 6.6, valor coherente con los descritos para histidinas en otras proteínas (Swenson y col., 1984; Holbrook y Ingram, 1973; Pérez-Gil y col., 1989; Cosineau y Meighen, 1976).

La hidroxilamina y el hidróxido sódico son capaces de retirar los grupos carboxi de las histidinas y tirosinas modificadas, pero no de lisinas ni de sulfhidrilos. Por esto, la reversión de la inactivación por tratamiento de la enzima con 1 M hidroxilamina o 0.1 M NaOH permitió descartar la modificación de lisinas y cisteínas por el DEP. Adicionalmente, el análisis de aminoácidos de las enzimas nativa y modificada mostró que durante la modificación con DEP no se formaban dicarboxihistidinas, lo que apoya la completa reversibilidad de la modificación.

La protección de la enzima de la inactivación por DEP ejercida por el sustrato o benzoato indica que alguno(s) de los residuos que sufren modificación se encuentran en (o cerca de) el centro activo.

El aumento de absorbancia a 242 nm permitió correlacionar el grado de inactivación con el número de residuos de histidina modificados. El procesamiento de los datos mediante el método estadístico de Tsou permitió determinar que un residuo de histidina es esencial para la actividad de la enzima.

Todos estos resultados, tomados en conjunto, apuntan por primera vez al papel de los grupos imidazol en la reacción catalizada por la DAAO de *Rhodotorula gracilis* (Ramon y col., 1995).

3.3 Identificación de un residuo esencial de triptófano

La NBS inactiva rápida y totalmente las formas apo- y holo- de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*.

La reacción de la NBS con proteínas puede modificar varias cadenas laterales de aminoácido (Spande y Witkop, 1967), pero los datos aquí presentados sugieren fuertemente que la inactivación de la DAAO por NBS en las condiciones usadas se debe a la modificación de residuos de triptófano. Esta conclusión viene apoyada por los siguientes hechos:

- la disminución de absorbancia a 280 nm fue paralela a la pérdida de actividad y a la extensión de la oxidación
- La ausencia de cambios de absorbancia a 263 nm descartó la modificación de residuos de tirosina
- el consumo de NBS no excedió 1.5 moles de reactivo por mol de enzima, mientras que el consumo de reactivo durante la oxidación de otros residuos es mucho mayor
- la disminución de emisión de fluorescencia a 335 nm fue coherente con los cambios de absorbancia a 280 nm
- la DAAO tratada con NBS retuvo la integridad de su estructura primaria
- no se detectó oxidación de cisteínas

La relación entre la actividad remanente y el número de residuos modificados por la NBS estudiada mediante el método de Tsou mostró que sólo un residuo de triptófano es esencial para la actividad de la DAAO. La observación cinética de que los órdenes de reacción respecto a la NBS son cercanos a 1, junto con la constatación de que la inactivación de ambas formas de la enzima es de pseudo-primer orden, sugieren que la modificación de un único residuo de triptófano es suficiente para la inactivación.

La total protección de la enzima frente a la inactivación por NBS ejercida por sustratos o benzoato indica que alguno(s) de los residuos de triptófano que sufren oxidación están localizados en (o cerca de) el centro activo.

La DAAO de *Rhodotorula gracilis* contiene 8 triptófanos por monómero en su secuencia. Es notable que la NBS modifica sólo 4 triptófanos en la apoproteína y dos en la holoenzima como se pudo calcular por absorción diferencial a 280 nm. Los triptófanos inalterados están aparentemente enterrados en un ambiente inaccesible para la NBS. La diferente sensibilidad a la NBS de las formas apo- y holo- refleja la sustancial diferencia conformacional entre ambas formas que ya había sido constatada en los estudios de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano (15% de hélice alfa para la holoenzima y 25% para la apoproteína).

En su conjunto, todos estos resultados apuntan al papel de los grupos indol en la reacción catalizada por la DAAO de *Rhodotorula gracilis*. La participación de residuos de triptófano en el centro activo de esta enzima no se había descrito previamente.

T23524

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

**Purificación y Caracterización de la
D-Aminoácido Oxidasa de
Rhodotorula gracilis (ATCC 26217)**

TESIS DOCTORAL

por

Fernando Antonio Ramón Olayo



* 5 3 0 9 8 6 4 4 7 7 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-381969-4

Directoras

Dra. Carmen Acebal Sarabia

Dra. M^a Pilar Castellón Borreguero

MADRID, ABRIL DE 1999



BIBLIOTECA

en contradicción con los resultados obtenidos en los estudios de modificación química de residuos, de mutagénesis dirigida y de análogos de cofactor.

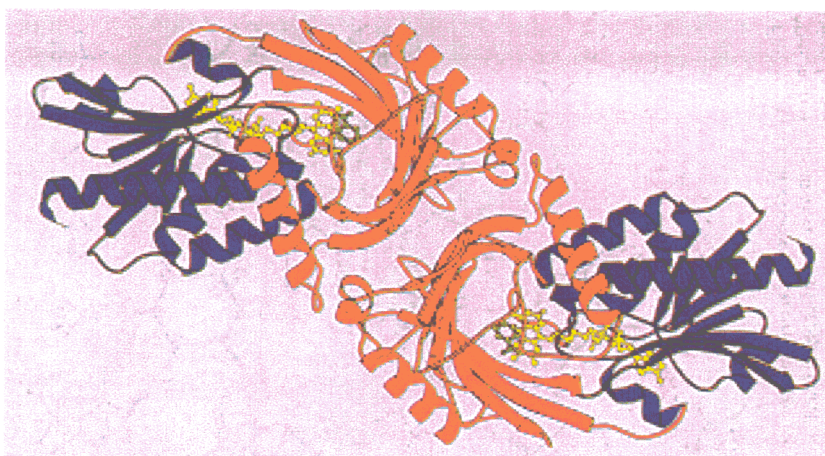


Figura 8. Diagrama MOLSCRIPT del dímero de la DAAO de riñón de cerdo. El diagrama se basa en la estructura tridimensional resuelta por cristalografía de rayos X. El dominio de interfaz está coloreado en rojo y el de unión a FAD en azul. Representaciones de varillas del FAD y el benzoato aparecen en amarillo y verde, respectivamente. La región "lazo" que comprende a los residuos 216-228 se muestra en negro (tomado de: Mattevi y col., 1966).

Cada monómero (Figura 9) está integrado por dominios de unión al FAD y de interacción con otro monómero, con una topografía general muy similar a la de la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa.

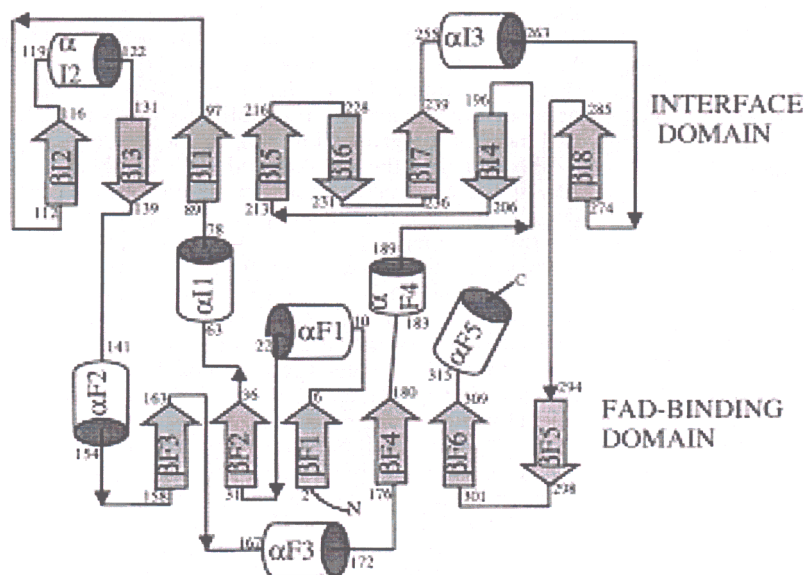


Figura 9. Topografía de estructura secundaria de la DAAO de riñón de cerdo. Las hélices α se muestran como cilindros y las láminas β como flechas. Los elementos de estructura secundaria de los dominios de interfaz y de unión a FAD están etiquetados con las letras I y F, respectivamente, seguidas de su número secuencial (tomado de: Mattevi y col., 1966).

3.4. Modelo propuesto

Tomando en consideración los datos publicados sobre los posibles residuos esenciales y los datos estructurales de diferentes DAAO's, e integrándolos con los resultados de los estudios aquí presentados de identificación de residuos esenciales, comparación de secuencias y modelamiento tridimensional, pueden extraerse varias conclusiones conducentes a la proposición de un modelo del mecanismo químico de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*.

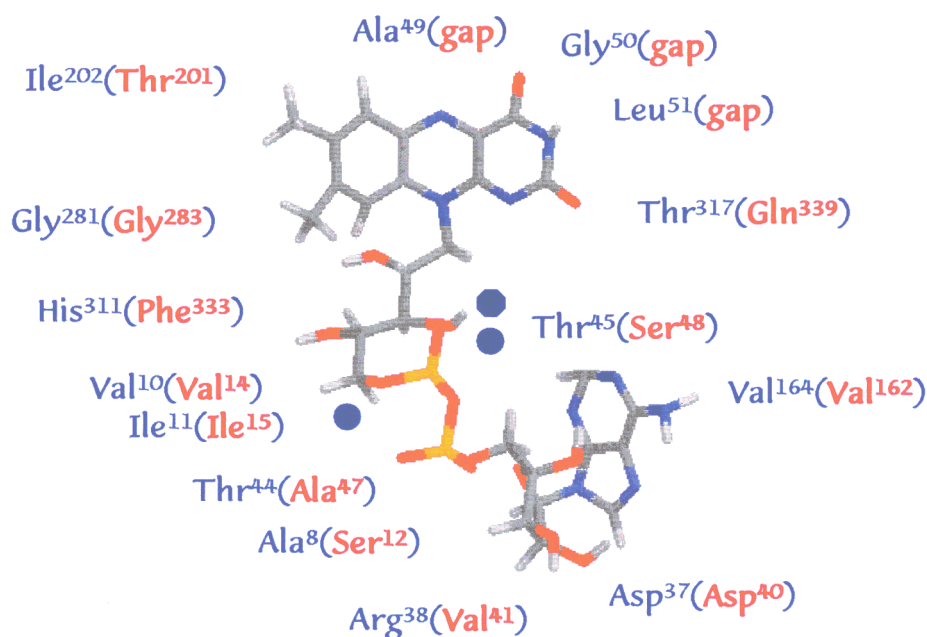


Figura 68. Representación esquemática de los residuos implicados en la unión de FAD en la enzima de riñón de cerdo. Los residuos están colocados en las inmediaciones de los grupos con los que interaccionan y en rojo se muestran los residuos correspondientes a la secuencia de la enzima de *Rhodotorula gracilis* según el alineamiento de la Figura A4 del Apéndice. Las esferas azules representan moléculas de agua.

Los últimos datos estructurales de la DAAO de riñón de cerdo (Mattevi y col., 1996) han permitido elaborar un mapa preciso del centro activo de la enzima. Estos resultados ponen de manifiesto marcadas diferencias entre la enzima de mamífero y la de levadura. De los 15 residuos que interaccionan con el FAD según los datos cristalográficos de la primera, sólo 5 están conservados en la secuencia de la segunda (Figura 68). No obstante, ambas enzimas contienen el motivo GXGYZG, característico de unión de ADP, y probablemente la enzima de levadura acomoda el FAD con un arreglo de dominios de estructura secundaria similar al observado en el caso de la de mamífero.

La arquitectura del centro activo de la enzima de riñón de cerdo ha sugerido la existencia de un mecanismo de reacción que implica a los residuos que figuran en la Tabla 13.

Tabla 13. Residuos implicados en el mecanismo de la semireacción reductiva de la DAAO de riñón de cerdo.

<u>DAAO de riñón de cerdo</u>		<u>DAAO de <i>R.gracilis</i>.</u>
<u>Residuo</u>	<u>Papel</u>	<u>Residuo correspondiente</u>
Tyr ²²⁸	Puente de hidrógeno con el carboxilo del sustrato	Tyr ²²³
Arg ²⁸³	Enlace iónico con el carboxilo del sustrato	Arg ²⁸⁵
Gly ³¹³	Puente de hidrógeno con la molécula de agua	Ser ³³⁴
Gln ⁵³	Puente de hidrógeno con la molécula de agua	Thr ⁵⁶
Tyr ²²⁴	Puente de hidrógeno con la molécula de agua y el amino del sustrato. Posible aceptor del protón del sustrato.	'Gap' (salto)

La falta de correspondencia entre los residuos esenciales de la DAAO de riñón de cerdo y los correspondientes en el alineamiento de la secuencia de *Rhodotorula gracilis* unida a la presencia de un residuo esencial de histidina y la ausencia de inactivación por modificación de tirosinas en la enzima de levadura indican que, si bien la reacción catalizada es la misma, el mecanismo químico difiere.

En el mecanismo catalítico de la DAAO de *Rhodotorula gracilis*, la His³²⁹ parece ser la base encargada de abstraer el protón del sustrato, al igual que en el caso de la glicolato oxidasa y, según parece, de la DAAO de *Trigonopsis variabilis*. La participación de uno de los residuos de ácido aspártico, conservados en todas las oxidasas comparadas, en un relé de carga con la His³²⁹, parece probable por analogía con la glicolato oxidasa.

No obstante, la hipótesis del carbanión ha sido criticada tras los análisis termodinámicos de Miura y Miyake (1988) y la resolución de las estructuras tridimensionales de varias oxidasas (DAAO de riñón de cerdo, flavocitocromo *b*₂, etc.), en las que no se observa ningún residuo en posición adecuada para actuar como nucleófilo sobre el hidrógeno α del sustrato. Estas críticas, junto a la observación de que el modo de unión del iminotriptófano al centro activo de la DAAO de riñón de cerdo se asemeja al observado en la unión del anillo de nicotinamida al centro activo de flavoenzimas dependientes de NAD(P)⁺, para las que se ha podido establecer la transferencia directa de hidrógeno desde el sustrato hacia la posición N⁵ de la flavina (Todone y col., 1997), han impulsado la hipótesis de un mecanismo concertado (Figura 69).

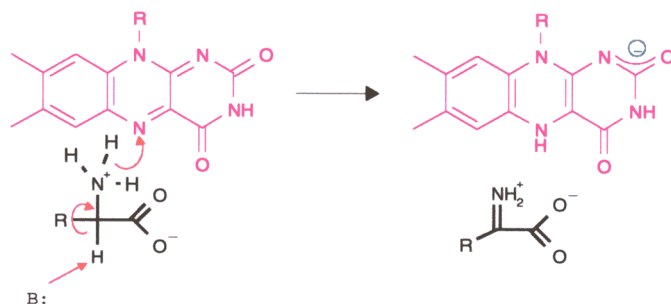


Figura 69. Representación esquemática de la hipótesis del mecanismo concertado para la reacción catalizada por la DAAO. B: representa a un nucleófilo de la enzima encargado de abstraer el protón α del sustrato desencadenando la transferencia directa de hidruro.

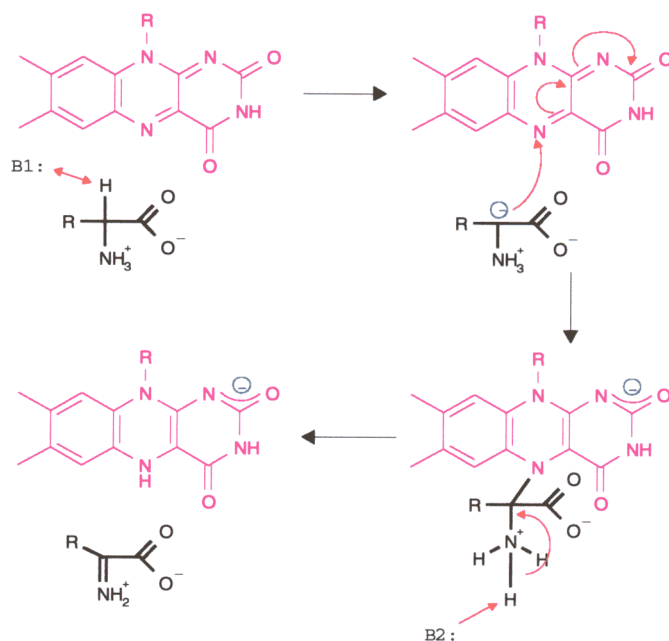


Figura 70. Representación esquemática de la hipótesis del carbanión para la reacción catalizada por la DAAO. B1: representa al nucleófilo encargado de abstraer el protón α del sustrato para formar el carbanión y B2: al nucleófilo que actúa sobre el α -amino del sustrato desencadenando la ruptura del aducto covalente sustrato/FAD.

Sin embargo, los estudios recientes de los efectos isotópicos sobre la semireacción reductiva de la DAAO (Denu y Fitzpatrick, 1994) aportan pruebas en contra de un mecanismo concertado y en favor de un patrón secuencial incluyendo la formación de un carbanión por abstracción del protón α del sustrato y el posterior ataque de dicho carbanión sobre la posición N⁵ de la flavina para formar un aducto covalente que se rompe finalmente por acción de un segundo nucleófilo de la enzima (Figura 70). Tomando en consideración todos los datos obtenidos durante el presente trabajo experimental y uniéndolos a los publicados por otros equipos investigadores sobre esta y otras oxidasas, estamos en condiciones de proponer un modelo de mecanismo químico para la reacción catalizada por la DAAO de *Rhodotorula gracilis* (Figura 71).

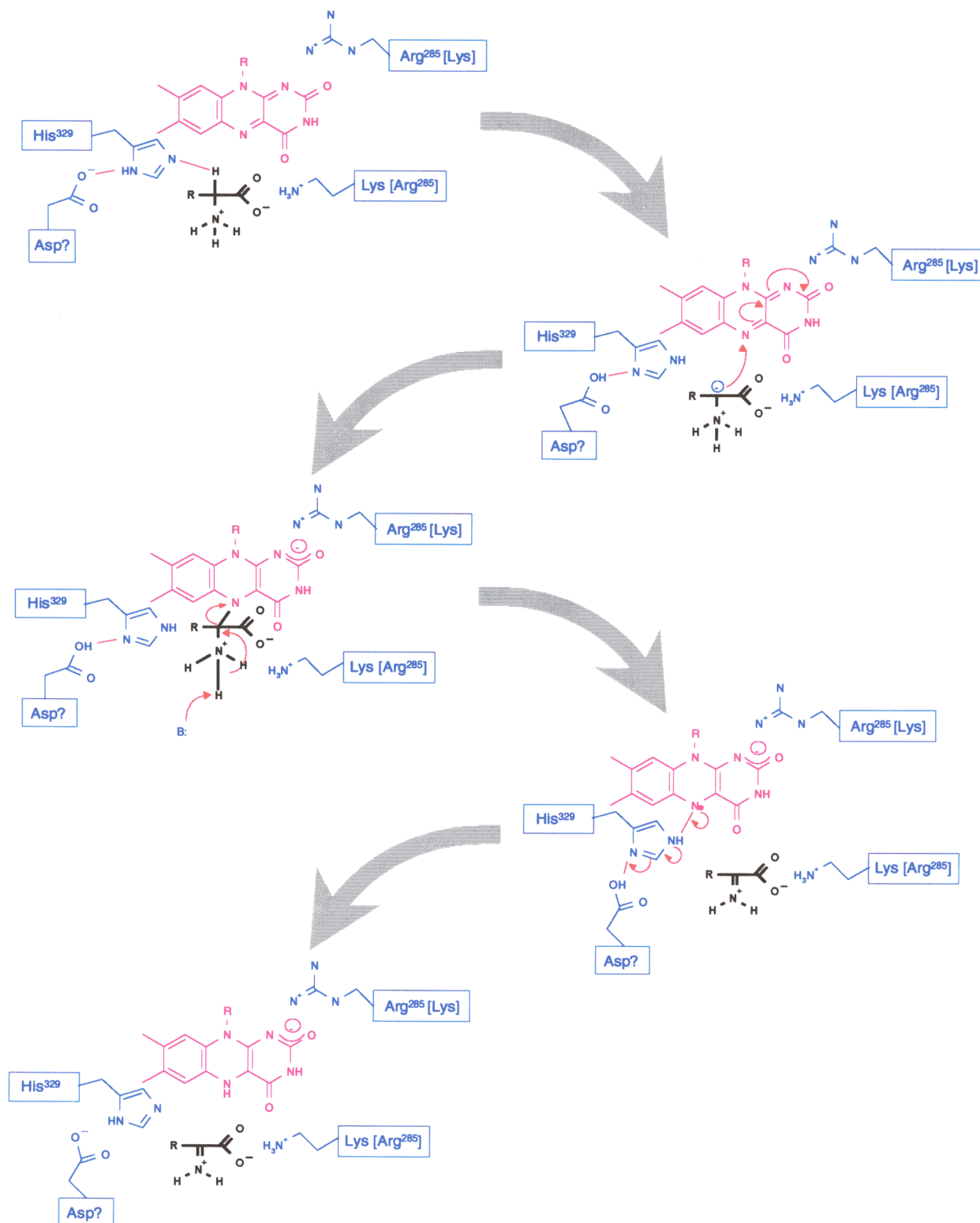


Figura 71. Representación esquemática del modelo propuesto para la reacción catalizada por la DAAO de *Rhodotorula gracilis*. B: representa un nucleófilo de la enzima encargado de actuar sobre el α -amino del sustrato desencadenando la ruptura del aducto covalente sustrato/FAD.

CONCLUSIONES

1. Se ha mejorado el **método de purificación** de la DAAO a partir de cultivos de *Rhodotorula gracilis* en condiciones de inducción y se han encontrado condiciones de **mayor estabilidad** de las preparaciones enzimáticas a lo largo del aislamiento.
2. Se ha desarrollado un método para la purificación de la enzima a partir de cultivos de un **clon de *Escherichia coli* que la hiperexpresa**. La enzima obtenida de esta forma no presenta características diferentes a las de la obtenida de células de levadura.
3. El H_2O_2 ejerce un doble efecto perjudicial sobre la actividad de la DAAO. Por un lado, se trata de un producto de la reacción y, como tal, ejerce una **inhibición** que es de tipo no competitivo con valores de K_i (K_{ii} y K_{is}) del mismo orden que la K_M cuando se usa D-alanina como sustrato (1 mM). Además, el H_2O_2 **oxida** residuos de triptófano y cisteína implicados muy probablemente en el proceso de dimerización.
4. La DAAO contiene un **residuo de histidina esencial para la catálisis**, probablemente implicado en la abstracción del protón α del sustrato. Los resultados de la comparación de secuencia con las enzimas de otras fuentes, así como de los experimentos de mutagénesis dirigida indican que se trata de la His³²⁹.
5. La DAAO contiene un **residuo de triptófano esencial para la catálisis**. Hasta el momento, no se había descrito la implicación de este tipo de residuos en la reacción catalizada por la enzima.
6. Los residuos modificados por NBS **no coinciden** con los oxidados por H_2O_2 . La DAAO parece contener residuos de triptófano esenciales para la **catálisis** y otros implicados en la **interacción entre monómeros**.
7. En contraste con la DAAO de riñón de cerdo, la enzima de *Rhodotorula gracilis* no presenta **ninguna tirosina esencial** para la catálisis.
8. Modificadores específicos de lisinas, argininas y cisteínas **inactivan** la DAAO, mientras que la modificación de metioninas o serinas **no afecta** significativamente a la actividad de la enzima.
9. Sobre la base de las comparaciones de secuencia entre diferentes oxidasas y los datos disponibles en la bibliografía sobre sus mecanismos químicos, puede concluirse que, aunque todas ellas catalizan **la misma reacción**, las enzimas de mamíferos parecen compartir un mecanismo que **difiere** del observado en las D-aminoácido oxidasas fúngicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, B.(1976) Preparation of pharmaceutical compounds by immobilized enzymes and cells, *Adv. Appl. Microbiol.* **20**, 203-257.
- Abraham, E.P. y Newton, G.G.F.(1961) The structure of cephalosporin C, *Biochem. J.* **79**, 377-393.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J.(1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Angermuller, S.(1989) Peroxisomal oxidases: cytochemical localization and biological relevance, *Prog. Histochem. Cytochem.* **20**, 1-65.
- Antonini, E., Brunori, M., Bruzzesi, R., Chiancone, E. y Massey, V.(1966) Association-dissociation phenomena of D-amino acid oxidase, *J. Biol. Chem.* **241**, 2358-2366.
- Aral, M., Ho Lee, T. y Murao, S.(1978) Substrate specificity of the *Penicillium lilacinum* enzyme litic to the cell wall of *Rhodotorula glutinis* and the structure of the *Rhodotorula* cell wall glucomannan, *Curr. Microbiol.* **1**, 185-188.
- Arnold, W.N.(1972) *p*-Toluenethiol as an initiator of autolysis in bakers' yeast, *J. Bacteriol.* **109**, 949-952.
- Arnold, W.N. (1997) Autolysis, en: *Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, Biophysics and Ultrastructure*, Vol.II, pp. 129-137. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bairoch, A. y Boeckmann, B.(1991) The SWISS-PROT protein sequence data bank, *Nucleic. Acids. Res.* **22**, 2247-2249.
- Basu, S., Mandal, C. and Allen, A.K. (1988) Chemical-modification studies of a unique sialic acid-binding lectin from the snail *Achatina fulica*, *Biochem. J.* **254**, 195-202.
- Batchelor, F.R., Doyle, F.P., Naylar, J.H.C. y Rolinson, G.N.(1959) Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations, *Nature*, **183**, 257-258.
- Blanschko, H. y Hawkins, J.(1952) D-amino acid oxidase in the molluscan liver, *Biochem. J.* **52**, 306-312.
- Bright, H.J. y Porter, D.J.T. (1975) Flavoprotein Oxidases, en: *The Enzymes* (Boyer, eds.) 3rd Edn., pp. 421-505.
- Brumby, P.E. y Massey, V.(1968) D-amino acid oxidase from pig kidney, *Biochem. Prep.* **12**, 29-34.
- Brückner, H. y Hausch, M.(1989) Gas chromatographic detection of D-amino acids as common constituents of fermented foods, *Chromatographia*, **28**, 487-492.
- Caldwell, P., Luk, D.C., Weissbach, H. y Brot, N.(1978) Oxidation of the methionine residues of *Escherichia coli* ribosomal protein L12 decreases the protein's biological activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 5349-5352.
- Casalin, P., Pollegioni, L., Curti, B. y Pilone Simonetta, M.(1991) A study on apoenzyme from *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase, *Eur. J. Biochem.* **197**, 513-517.
- Catley, B.J. (1988) Isolation and analysis of cell walls, en: *Yeast. A practical approach* (Campbell, I. y Duffs, J.H. eds.) pp. 163-183. IRL Press,
- Chapman, G.E., Hartman, P.G. y Bradbury, E.M.(1976) Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H1 in eukaryote chromatin. The isolation of the globular and non-globular regions of the H1 histone molecule, *Eur. J. Biochem.* **61**, 69-75.
- Charlwood, P.A., Palmer, G. y Bennet, R.(1962) Association phenomena in the ultracentrifugal behavior of D-amino acid oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 17-21.
- Chassy, B.M. y McCormick, D.B.(1965) Coenzyme specificity of D-amino acid oxidase for the flavin moiety of FAD, *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 91-96.
- Chou, P.Y. (1990) Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Compositions, en: *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, pp. 549-586. Plenum Press, New York.
- Chou, P.Y. y Fasman, G.D.(1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence, *Adv. Enzymol.* **47**, 45-148.
- Cleland, W.W.(1977) Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies , *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **45**, 273-387.

- Cleland, W.W.(1982) The use of pH studies to determine chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions, *Methods Enzymol.* **87**, 390-405.
- Clewley, J.P.(1995) Macintosh sequence analysis software. DNASTar's LaserGene, *Mol. Biotechnol.* **3**, 221-224.
- Corrigan, J.J.(1969) D-amino acids in mammals, *Science*, **164**, 142-149.
- Cosineau, J. y Meighen, E.(1976) Chemical modification of bacterial luciferase with ethoxyformic anhydride: Evidence for an essential histidyl residue, *Biochemistry*, **15**, 4992-5000.
- Curti, B., Ronchi, S., Branzoli, U., Ferri, G. y Williams, C.H.(1973) Improved purification, amino acid analysis and molecular weight of homogenous D-amino acid oxidase from pig kidney, *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 266-273.
- Curti, B., Ronchi, S. y Pilone Simonetta, M.P. (1992) D- and L-Amino Acid Oxidases, en: *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Muller, F. eds.) pp. 69-94.CRC Press, Boca Raton. Florida.
- D'Aniello, A., D'Onofrio, G., Pischetola, M., D'Aniello, G., Vetere, A., Petrucelli, L. y Fisher, G.H.(1993a) Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids, *J. Biol. Chem.* **268**, 26941-26949.
- D'Aniello, A., Vetere, A. y Petrucelli, L.(1993b) Further study on the specificity of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase and time course for complete oxidation of D-amino acids, *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, **105**, 731-734.
- de la Mata, I., Ramón, F., Obregón, V., Castellón, M. y Acebal, C. (1998) Effect of hydrogen peroxide on D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*, en imprenta.
- de la Mata, I., Obregón, V., Ramón, F., Castellón, M. y Acebal, C. (1998) Chemical modification of tryptophan residues of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*, en preparación.
- D'Silva, C., Williams, C.H. y Massey, V.(1986) Electrophilic amination of a single methionine residue located at the active site of D-amino acid oxidase by O-(2,4-dinitrophenyl)hydroxylamine, *Biochemistry*, **25**, 5602-5608.
- D'Silva, C., Williams, C.H., Jr. y Massey, V.(1987) Identification of methionine-110 as the residue covalently modified in the electrophilic inactivation of D-amino-acid oxidase by O-(2,4-dinitrophenyl) hydroxylamine, *Biochemistry*, **26**, 1717-1722.
- Dixon, H.B.(1976) The unreliability of estimates of group dissociation constants, *Biochem. J.* **153**, 627-633.
- Dixon, M. y Kleppe, K.(1965a) D-amino acid oxidase. II. Specificity, competitive inhibition and reaction sequence, *Biochim. Biophys. Acta*, **96**, 368-374.
- Dixon, M. y Kleppe, K.(1965b) D-amino acid oxidase. III. Effect of pH, *Biochim. Biophys. Acta*, **96**, 383-388.
- Eisenberg, D., Weiss, R.M. y Terwilliger, T.C.(1984) The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 140-144.
- Ellman, G.L.(1959) Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
- Eyzaguirre, J. (1987) "Chemical modification of enzymes. Active site studies" Ellis Horwood Ltd., Chichester, Reino Unido.
- Faotto, L., Pollegioni, L., Ceciliani, F., Ronchi, S. y Pilone, M.S. (1995) The primary structure of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*, *Biotechnol. Lett.* **17**, 193-198.
- Ferti, C., Curti, B., Simonetta, M.P., Ronchi, S., Galliano, M. y Minchiotti, L.(1981) Reactivity of D-amino acid oxidase with 1,2-cyclohexanedione: evidence for one arginine in the substrate-binding site, *Eur. J. Biochem.* **119**, 553-557.
- Fitzpatrick, P.F. y Massey, V.(1982a) Proton release during the reductive half-reaction of D-amino acid oxidase, *J. Biol. Chem.* **257**, 9958-9962.
- Fitzpatrick, P.F. y Massey, V.(1982b) The kinetic mechanism of D-amino acid oxidase with D- α -aminobutyrate as substrate. Effect of enzyme concentration on the kinetics, *J. Biol. Chem.* **257**, 12916-12923.

- Fitzpatrick, P.F. y Massey, V.(1982c) Thiazolidine-2-carboxylic acid, an adduct of cysteamine and glyoxylate, as a substrate for D-amino acid oxidase, *J. Biol. Chem.* **257**, 1166-1171.
- Fitzpatrick, P.F. y Massey, V.(1983) The reaction of 8-mercaptoflavins and flavoproteins with sulfite. Evidence for the role of an active site arginine in D-amino acid oxidase, *J. Biol. Chem.* **258**, 9700-9705.
- Fleming, A.(1929) *Br. J. Exp. Pathol.* **10**, 226-239.
- Fonda, M.L. y Anderson, B.M.(1967) D-amino acid oxidase. I. Spectrophotometric studies, *J. Biol. Chem.* **242**, 3957-3962.
- Fonda, M.L. y Anderson, B.M.(1968) D-amino acid oxidase. II. Studies of substrate-competitive inhibitors, *J. Biol. Chem.* **243**, 1931-1935.
- Fonda, M.L. y Anderson, B.M.(1969) D-amino acid oxidase. IV. Inactivation by maleimides, *J. Biol. Chem.* **244**, 666-674.
- Freisheim, J.H. y Huennekens, F.M. (1969) Effect of N-bromosuccinimide on dihydrofolate reductase, *Biochemistry* **8**, 2271-2276.
- Fujii, T., Matsumoto, K. y Watanabe, T.(1976) Enzymatic synthesis of cephalixin, *Process Biochem.* **11**, 21-24.
- Fukui, K. (1997) Tissue specific expression of the D-amino acid oxidase gene, en: Stevenson KJ, Massey V, Williams CH Jr, eds. *Flavins and flavoproteins 1996. Proceedings of the 12th International Symposium; 1996 June 30-July 6; Calgary (Alberta, Canada)*. University of Calgary Press, pp.199-202.
- Gadda, G., Negri, A. y Pilone, M.S.(1994) Reaction of phenylglyoxal with arginine groups in D-amino-acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*, *J. Biol. Chem.* **269**, 17809-17814.
- García-Segura, J.M.(1996) Fluorescencia de proteínas, en: *Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica*, pp.153-163, Editorial Síntesis, Madrid.
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. y Robson, B.(1978) Analysis of the accuracy and implications of simple method for predicting the secondary structure of globular proteins, *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120.
- Ghisla, S., Massey, V. y Choong, Y.S.(1979) Covalent adducts of lactate oxidase. Photochemical formation and structure identification, *J. Biol. Chem.* **254**, 10662-10669.
- Ghisla, S. y Massey, V.(1986) New flavins for old problems: artificial flavins as active site probes of flavoproteins, *Biochem. J.* **239**, 1-12.
- Ghisla, S. y Massey, V.(1989) Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions, *Eur. J. Biochem.* **181**, 1-17.
- Guerritore, A. y Hanozet, G.M.(1970) Presence and adaptative changes of citrate cleavage enzyme in *Rhodotorula gracilis*, *Experientia*, **26**, 28-30.
- Hachimori, Y., Horinishi, H., Kurihara, K. y Shibata, K. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, **93**, 346-360
- Hamilton, G.A., Buckthal, D.J., Mortensen, R.M. y Zerby, K.W.(1979) Reactions of cysteamine and other amine metabolites with glyoxylate and oxygen catalyzed by mammalian D-amino acid oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 2625-2629.
- Hamilton, G.A.(1985) Peroxisomal oxidases and suggestions for the mechanism of action of insulin and other hormones, *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **57**, 85-178.
- Harper, A.E., Benevenga, N.J. y Wohlheuter, R.M.(1970) Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids, *Physiol. Rev.* **50**, 428-558.
- Hersh, L.B. y Jorns, M.S.(1975) Use of 5-deazaFAD to study hydrogen transfer in the D-amino acid oxidase reaction, *J. Biol. Chem.* **250**, 8728-8734.
- Higgins, D.G. y Sharp, P.M.(1989) Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer, *CABIOS*, **5**, 151-153.
- Holbrook, J.J. y Ingram, V.A.(1973) Ionic properties of an essential histidine residue in pig heart lactate dehydrogenase, *Biochem. J.* **131**, 729-738.
- Hopp, T.P. y Woods, K.R.(1981) Prediction of Protein Antigenic Determinants from Amino Acid Sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 3824-3828.

- Horiike, K., Shiga, K., Isomoto, A. y Yamano, T.(1974) Effect of quasi-substrate on the monomer-dimer equilibrium of D-amino acid oxidase, *J. Biochem. (Tokyo)*, **75**, 925-929.
- Horiike, K., Tojo, H., Arai, R., Yamano, T., Nozaki, M. y Maeda, T.(1987) Localization of D-amino acid oxidase in Bergmann glial cells and astrocytes of rat cerebellum, *Brain Res. Bull.* **19**, 587-596.
- Hunkapiller, M.W., Smallcombe, S.H., Whitacker, D.R. y Richards, J.H.(1973) Carbon nuclear magnetic resonance studies of the histidine residue in alpha-lytic protease. Implications for the catalytic mechanism of serine proteases, *Biochemistry*, **12**, 4732-4743.
- Isogai, T., Ono, H., Ishitani, Y., Kojo, H., Ueda, Y. y Kohsaka, M.(1990) Structure and expression of cDNA for D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani*, *J. Biochem. (Tokyo)*, **108**, 1063-1069.
- Jameson, B.A. y Wolf, H.(1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, *CABIOS*, **4**, 181-186.
- Jones, H. y Venables, W.A.(1983) Effects of solubilisation on some properties of the membrane- bound respiratory enzyme D-amino acid dehydrogenase of *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* **151**, 189-192.
- Karplus, A.P. y Schulz, G.E.(1987) Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **195**, 701-729.
- Kocková-Kratochvílová, A. y Holan, Z.(1976) Cytological and chemical changes in cell walls of *Rhodotorula gracilis*. III. Characteristics and life cycle of the yeast, *Folia Microbiol.* **21**, 83-89.
- Koepepe, R.E.2d. y Stroud, R.M.(1976) Mechanism of hydrolysis by serine proteases: direct determination of the pKa's of aspartyl-102 and aspartyl-194 in bovine trypsin using difference infrared spectroscopy, *Biochemistry*, **15**, 3450-3458.
- Kollár, R., Petráková, E., Ashwell, G., Robbins, P.W. y Cabib, E.(1995) Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and $\beta(1-3)$ -glucan, *J. Biol. Chem.* **270**, 1170-1178.
- Konno, R., Isobe, K., Niwa, A. y Yasumura, Y.(1988a) Excessive urinary excretion of methionine in mutant mice lacking D-amino- acid oxidase activity, *Metabolism*, **37**, 1139-1142.
- Konno, R., Isobe, K., Niwa, A. y Yasumura, Y.(1988b) Lack of D-amino-acid oxidase activity causes a specific renal aminoaciduria in the mouse, *Biochim. Biophys. Acta*, **967**, 382-390.
- Konno, R., Nagata, Y., Niwa, A. y Yasumura, Y.(1989) Spontaneous excretion of D-alanine in urine in mutant mice lacking D- amino-acid oxidase, *Biochem. J.* **261**, 285-287.
- Konno, R., Niwa, A. y Yasumura, Y.(1990) Intestinal bacterial origin of D-alanine in urine of mutant mice lacking D- amino-acid oxidase, *Biochem. J.* **268**, 263-265.
- Konno, R. y Yasumura, Y.(1981) Activity and substrate specificity of D-amino acid oxidase in kidneys of various animals, *Zool. Mag. (Tokyo)*, **90**, 1368-1376.
- Konno, R. y Yasumura, Y.(1984) Involvement of D-amino-acid oxidase in D-amino acid utilization in the mouse, *J. Nutr.* **114**, 1617-1621.
- Krebs, H.A.(1935) Metabolism of D-amino acids. III. Deamination of D-amino acids, *Biochem. J.* **29**, 1620-1632.
- Krebs, H.A.(1951) Oxidation of amino acids, *Enzymes*, **2**, 499-505.
- Kubicek-Pranz, E.M. y Röhr, M.(1985) D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis variabilis*, *J. Appl. Biochem.* **7**, 104-113.
- Kubo, H., Yamano, T., Iwatsubo, M., Watari, H., Soyama, T., Shiraishi, J., Sawada, S., Kawashima, N., Mitani, S. y Ito, K.(1958) Sur l'interaction entre l'enzyme et le coenzyme dans le systeme de la déshydrogénase de l'acide glutamique et celui de l'oxydase des acides aminés, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 431-440.
- Kyte, J. y Doolittle, R.F.(1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.

- Laemmli, U.K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Lakowicz, J.R. (1984) *XI. Protein Fluorescence*, en: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pp.342-381, Plenum Press, New York.
- Lazarow, P.B. y de Duve, C.(1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 2043-2046.
- Lehmann, W.D., Theobald, N., Fischer, R. y Heinrich, H.C.(1983) Stereospecificity of phenylalanine plasma kinetics and hydroxylation in man following oral application of a stable isotope-labelled pseudo-racemic mixture of L- and D-phenylalanine, *Clin. Chim. Acta*, **128**, 181-198.
- Lindqvist, Y. (1992) Glycolate oxidase, en: *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Muller, F. eds.) pp. 367-387.CRC Press, Boca Raton. Florida.
- Lindqvist, Y. y Branden, C.I.(1989) The active site of spinach glycolate oxidase, *J. Biol. Chem.* **264**, 3624-3628.
- Lundblad, R.L. y Noyes, C.M. (1985) Chemical modification of tryptophan, en: *Chemical Reagents for Protein Modification*, pp. 47-71.CRC Press, Boca Raton. Florida.
- Lyle, L.R. y Jutila, J.W.(1968) D-amino acid oxidase induction in the kidneys of germ-free mice, *J. Bacteriol.* **96**, 606-608.
- Man, E.H. y Bada, J.L.(1987) Dietary D-amino acids, *A. Rev. Nutr.* **7**, 209-225.
- Marcilla, A., Mormeneo, S., Elorza, M.V., Manclus, J.J. y Sentandreu, R.(1993) Wall formation by *Candida albicans* yeast cells: synthesis, secretion and incorporation of two types of mannoproteins, *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2985-2993.
- Marcotte, P. y Walsh, C.(1978) Properties of D-amino acid oxidase covalently modified upon its oxidation of D-propargylglycine, *Biochemistry*, **17**, 2864-2868.
- Mares, D.(1982) Ultrastructural and cytochemical study of *Rhodotorula glutinis* in the main growth phases, *Mycopathologia*, **80**, 179-188.
- Massey, V., Curti, B. y Ganther, H.(1966) A temperature-dependent conformational change in D-amino acid oxidase and its effect on catalysis, *J. Biol. Chem.* **241**, 2347-2357.
- Massey, V., Curti, B., Müller, F. y Mayhew, S.G.(1968) On the reaction of borohydride with D- and L-amino acid oxidases, *J. Biol. Chem.* **243**, 1329-1330.
- Massey, V., Müller, F., Feldberg, R., Schuman, M., Sullivan, P.A., Howell, L.G., Mayhew, S.G., Matthews, R.G. y Foust, G.P.(1969a) The reactivity of flavoproteins with sulfite. Possible relevance to the problem of oxygen reactivity, *J. Biol. Chem.* **244**, 3999-4006.
- Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S.G., Howell, L.G., Engel, P.C., Matthews, R.G., Schuman, M. y Sullivan, P.A.(1969b) The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 891-897.
- Massey, V., Claiborne, A., Biemann, M. y Ghisla, S.(1984) 4-Thioflavins as active site probes of flavoproteins. General properties, *J. Biol. Chem.* **259**, 9667-9678.
- Massey, V.(1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins, *J. Biol. Chem.* **269**, 22459-22462.
- Massey, V. y Curti, B.(1966) A new method of preparation of D-amino acid oxidase apoprotein and a conformational change after its combination with flavin adenine dinucleotide, *J. Biol. Chem.* **241**, 3417-3423.
- Massey, V. y Ganther, H.(1965) On the interpretation of the absorption spectra of flavoproteins with special reference to D-amino acid oxidase, *Biochemistry*, **4**, 1161-1173.
- Massey, V. y Hemmerich, P.(1980) Active-site probes of flavoproteins, *Biochem. Soc. Trans.* **8**, 246-257.
- Mattevi, A., Vanoni, M.A., Todone, F., Rizzi, M., Teplyakov, A., Coda, A., Bolognesi, M. y Curti, B.(1996) Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7496-7501.

- Mazzeo, P. y Romeo, A.(1972) Enzymatic and chemical transformation of the side chain of cephalosporin C, *J. Chem. Soc. Perkin I*, **20**, 2532-2538.
- McCormick, D.B., Chassy, B.M. y Tsibris, J.C.M.(1964) Coenzyme specificity of D-amino acid oxidase for the adenylate moiety of FAD, *Biochim. Biophys. Acta*, **89**, 447-453.
- Meister, A. (1965) *Biochemistry of the Amino Acids* Anonymous 2nd Edn., pp. 220-224, 297-304. Academic Press, New York,
- Meister, A. y Wellner, D.(1963) Flavoprotein amino acid oxidases, *Enzymes*, **7**, 609-617.
- Miles, E.W.(1977) Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate, *Methods Enzymol.* **47**, 431-442.
- Miura, R. y Miyake, Y.(1988) The reaction mechanism of D-amino acid oxidase: concerted or not concerted?, *Bioorg. Chem.* **16**, 97-110.
- Miyake, Y., Fukui, K., Momoi, K., Watanabe, F. y Shibata, T. (1987) Biogenesis and *in vivo* reaction with D-propargylglycine, en: *Flavins and Flavoproteins* (Edmondson, D.E. y McCormick, D.B. eds.) pp. 501-505, de Gruyter & Co. Berlin,
- Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Nishina, Y., Shiga, K., Setoyama, C. y Miura, R.(1996) Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid oxidase at 3.0 Å resolution, *J. Biochem. (Tokyo)*, **120**, 14-17.
- Momoi, K., Fukui, K., Watanabe, F. y Miyake, Y.(1988) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human kidney D- amino acid oxidase, *FEBS Lett.* **238**, 180-184.
- Moreno, C.M.(1986) Theoretical approaches to D-amino acid oxidase, *J. Theor. Biol.* **119**, 369-378.
- Müh, U., Massey, V. y Williams, C.H.J.(1994) Lactate monooxygenase. III.Additive contributions of active site residues to catalytic efficiency and stabilization of an anionic transition state, *J. Biol. Chem.* **269**, 7994-8000.
- Müller, F., Massey, V., Heizmann, C., Hemmerich, P., Lhoste, J.-M. y Gould, D.C.(1969) The reduction of flavins by borohydride: 3,4 dihydroflavin. Structure, absorption and luminescence, *Eur. J. Biochem.* **9**, 392-401.
- Nagata, Y., Konno, R., Yasumura, Y. y Akino, T.(1989) Involvement of D-amino acid oxidase in elimination of free D-amino acids in mice, *Biochem. J.* **257**, 291-292.
- Neims, A.H. y Hellerman, L.(1962) Specificity of D-amino acid oxidase in relation to glycine oxidase activity, *J. Biol. Chem.* **237**, PC976
- Neims, A.H. y Hellerman, L.(1970) Flavoenzymes catalysis, *Ann. Rev. Biochem.* **39**, 867-888.
- Neumann, N.P.(1972) Oxidation with Hydrogen Peroxide, *Methods Enzymol.* **28**, 393-400.
- Nishina, Y., Tojo, H. y Shiga, K.(1986) Complex formation between reduced D-amino acid oxidase and pyridine carboxylates, *J. Biochem. (Tokyo)*, **99**, 673-680.
- Nishino, T., Massey, V. y Williams, C.H.(1980) Chemical modifications of D-amino acid oxidase. Evidence for active site histidine, tyrosine, and arginine residues, *J. Biol. Chem.* **255**, 3610-3616.
- Ohnishi, M., Kawagishi, T., Abe, T. y Hiromi, K.(1980) Stopped-flow studies on the chemical modification with *N*-bromosuccinimide of model compounds of tryptophan residues, *J. Biochem. (Tokyo)*, **87**, 273-279.
- Olsiewski, P.J., Kaczorowski, G.J. y Walsh, C.(1980) Purification and properties of D-amino acid dehydrogenase, an inducible membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme from *Escherichia coli* B, *J. Biol. Chem.* **255**, 4487-4494.
- Parsons, S.M. y Raferty, M.A.(1972) Ionization behavior of the catalytic carboxyls of lysozyme. Effects of temperature, *Biochemistry*, **11**, 1630-1633.
- Peitsch, M.C.(1995) Protein modeling by email, *Biotechnology*, **13**, 658-659.
- Peitsch, M.C.(1996) Promod and Swiss-Model: internet-based tools for automated comparative protein modelling, *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 274-278.
- Pelmont, J., Arlaud, G. y Rossat, A.(1972) L-amino acide oxidases des enveloppes de *Proteus mirabilis*: Properties generales, *Biochimie*, **54**, 1359-1374.

- Perotti, M.E., Gavazzi, E., Trussardo, L., Malgaretti, N. y Curti, B.(1987) Immunoelectron microscopic localization of D-amino acid oxidase in rat kidney and liver, *Histochem. J.* **19**, 157-169.
- Perotti, M.E., Pollegioni, L. y Pilone, M.S.(1991) Expression of D-amino acid oxidase in *Rhodotorula gracilis* under induction conditions: a biochemical and cytochemical study, *Eur. J. Cell Biol.* **55**, 104-113.
- Pérez-Gil, J., Martín, J., Acebal, C. y Arche, R.(1989) Essential histidyl residues in lisolecithin:lisolecithin acyl-transferase from rabbit lung, *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 562-568.
- Pilone Simonetta, M., Pollegioni, L., Casalin, P., Curti, B. y Ronchi, S.(1989) Properties of D-amino-acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*, *Eur. J. Biochem.* **180**, 199-204.
- Pistorius, E.K. y Voss, H.(1977) A D-amino acid oxidase from *Chlorella vulgaris*, *Biochim. Biophys. Acta*, **481**, 395-406.
- Plasterer, T.N.(1997) PROTEAN. Protein sequence analysis and prediction, *Methods Mol. Biol.* **70**, 227-239.
- Pollegioni, L., Campaner, S., Raibekas, A.A. y Pilone, M.S. (1997) Identification of a reactive cysteine in the flavin-binding domain of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* **343**, 1-5.
- Pollegioni, L., Cecilian, F., Curti, B., Ronchi, S. y Pilone, M.S. (1995) Studies on the structural and functional aspects of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase by limited trypsinolysis, *Biochem. J.*, **310**, 513-517.
- Pollegioni, L., Falbo, A. y Pilone, M.S.(1992) Specificity and kinetics of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1120**, 11-16.
- Pollegioni, L., Langkau, B., Tischer, W., Ghisla, S. y Pilone, M.S.(1993) Kinetic mechanism of D-amino acid oxidases from *Rhodotorula gracilis* and *Trigonopsis variabilis*, *J. Biol. Chem.* **268**, 13850-13857.
- Pollegioni, L. y Pilone, M.S.(1992) Purification of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase, *Protein Expr. Purif.* **3**, 165-167.
- Porter, D.J., Voet, J.G. y Bright, H.J.(1972) Nitromethane. A novel substrate for D-amino acid oxidase, *J. Biol. Chem.* **247**, 1951-1953.
- Quay, S. y Massey, V.(1977) Effect of pH on the interaction of benzoate and D-amino acid oxidase, *Biochemistry*, **16**, 3348-3354.
- Raibekas, A.A. y Massey, V.(1997) Glycerol-assisted restorative adjustment of flavoenzyme conformation perturbed by site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.* **272**, 22248-22252.
- Ramon, F., Castillon, M., Delamata, I., y Acebal, C.(1998) Chemical mechanism of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*: pH dependence of kinetic parameters, *Biochem. J.* **330**(1), 311-314.
- Ramon, F., Delamata, I., Iannacone, S., Castillon, M.P. y Acebal, C.(1995) Chemical modification of histidyl residues in D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*, *J. Biochem. (Tokyo)*, **118**, 911-916.
- Rao, N.A., Nishikimi, M. y Yagi, K.(1972) Reactivity of D-amino acid oxidase with artificial electron acceptors, *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 350-362.
- Ronchi, S., Galliano, M., Minchiotti, L., Curti, B., Rudie, N.G., Porter, D.J. y Bright, H.J.(1980) An active site-tyrosine-containing heptapeptide from D-amino acid oxidase, *J. Biol. Chem.* **255**, 6044-6046.
- Ronchi, S., Minchiotti, L., Galliano, M., Curti, B., Swenson, R.P., Williams, C.H. y Massey, V.(1982a) The primary structure of D-amino acid oxidase from pig kidney. II. Isolation and sequence of overlap peptides and the complete sequence, *J. Biol. Chem.* **257**, 8824-8834.
- Ronchi, S., Minchiotti, L., Galliano, M., Curti, B., Swenson, R.P., Williams, C.H.J. y Massey, V. (1982b) The complete amino acid sequence of D-amino acid oxidase from pig kidney, en: *Flavins and Flavoproteins* (Massey, V. y Williams, C.H.J. eds.) pp. 66-74, Elsevier/North-Holland, Amsterdam,

- Rosenfeld, M.G. y Leiter, E.H.(1977) Isolation and characterization of mitochondrial D-amino acid oxidase from *Neurospora crassa*, *Can. J. Microbiol.* **55**, 66-74.
- Rudie, N.G., Porter, D.J. y Bright, H.J.(1980) Chlorination of an active site tyrosyl residue in D-amino acid oxidase by N-chloro-D-leucine, *J. Biol. Chem.* **255**, 498-508.
- Ruiz-Herrera, J., Mormeneo, S., Vanaclocha, P., Font-de-Mora, J., Iranzo, M., Puertes, I. y Sentandreu, R.(1994) Structural organization of the components of the cell wall from *Candida albicans*, *Microbiology*, **140**, 1513-1523.
- Sakaguchi, K. y Murao, S.(1950) A preliminary report on a new enzyme, penicillin-amidase, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 411-414.
- Schirmer, R.H. y Schulz, G.E. (1983) Flavoproteins of known three-dimensional structure, Colloquium-Mossbach, en: *Biological Oxidations* (Sund, H. y Ullrich, V. eds.) pp. 93-97, Springer, Berlin,
- Shah, A., de Biasi, V. y Camilleri, P.(1995) Development of a spectrophotometric method for the measurement of thiols at trace levels, *Anal. Proc. Incl. Anal. Comm.* **32**, 149-153.
- Shiga, K. y Shiga, T.(1972) The kinetic features of monomers and dimers in high- and low-temperature conformational states of D-amino acid oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 294-303.
- Simonetta, M.P., Vanoni, M.A. y Casalin, P.(1987) Purification and properties of D-amino acid oxidase, an inducible flavoenzyme from *Rhodotorula gracilis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **914**, 136-142.
- Simonetta, M.P., Verga, R., Fretta, A. y Hanozet, G.M.(1989) Induction of D-amino acid oxidase by D-alanine in *Rhodotorula gracilis* grown in defined medium, *J. Gen. Microbiol.* **135**, 593-600.
- Spande, T.F. y Witkop, B.(1967) Determination of tryptophan content of protein with *N*-bromosuccinimide, *Methods Enzymol.* **11**, 498-505.
- Stapley, E.O., Jackson, M., Hernandez, S., Zimmerman, S.B., Currie, S.A., Mochales, S., Mata, J.M., Woodruff, H.B. y Hendlin, D.(1972) Cephamycins, a new family of β -lactam antibiotics. I. Production by actinomycetes, including *Streptomyces lactamdurans* sp. n. *Antimicrob. Agents&Chemoth.* **2**, 122-131.
- Stegink, L.D., Moss, J., Printen, K.J. y Cho, E.S.(1980) D-Methionine utilization in adult monkeys fed diets containing DL-methionine, *J. Nutr.* **110**, 1240-1246.
- Stinson, R.A.(1973) Equilibrium binding of nicotinamide nucleotides to lactate dehydrogenases, *Biochem. J.* **131**, 719-728.
- Stumpf, P.K. y Green, D.E.(1944) L-amino acid oxidase of *Proteus vulgaris*, *J. Biol. Chem.* **153**, 387-393.
- Stumpf, P.K. y Green, D.E.(1946) D-amino acid oxidase of *Proteus morganii*, *Fed. Proceed.* **5**, 157-161.
- Swenson, R.P., Williams, C.H. y Massey, V.(1982) Chemical modification of D-amino acid oxidase. Amino acid sequence of the tryptic peptides containing tyrosine and lysine residues modified by fluorodinitrobenzene, *J. Biol. Chem.* **257**, 1937-1944.
- Swenson, R.P., Williams, C.H. y Massey, V.(1983) Identification of the histidine residue in D-amino acid oxidase that is covalently modified during inactivation by 5-dimethylaminonaphthalene-1- sulfonyl chloride, *J. Biol. Chem.* **258**, 497-502.
- Swenson, R.P., Williams, C.H. y Massey, V.(1984) Methylation of the active center histidine 217 in D-amino acid oxidase by methyl-p-nitrobenzenesulfonate, *J. Biol. Chem.* **259**, 5585-5590.
- Tarelli, G.T., Vanoni, M.A., Negri, A. y Curti, B.(1990) Characterization of a fully active N-terminal 37-kDa polypeptide obtained by limited tryptic cleavage of pig kidney D-amino acid oxidase, *J. Biol. Chem.* **265**, 21242-21246.
- Todone, F., Vanoni, M.A., Mozzarelli, A., Bolognesi, M., Coda, A., Curti, B. y Mattevi, A.(1997) Active site plasticity in D-amino acid oxidase: a crystallographic analysis, *Biochemistry*. **36**, 5853-5860.

- Tojo, H., Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Watari, H. y Yamano, T.(1985a) Self-association mode of a flavoenzyme D-amino acid oxidase from hog kidney. II. Stoichiometry of holoenzyme association and energetics of subunit association, *J. Biol. Chem.* **260**, 12615-12621.
- Tojo, H., Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Watari, H. y Yamano, T.(1985b) Self-association mode of a flavoenzyme D-amino acid oxidase from hog kidney. I. Analysis of apparent weight-average molecular weight data for the apoenzyme in terms of models, *J. Biol. Chem.* **260**, 12607-12614.
- Topham, C.M.(1985) Chemical modification of enzymes: Reaction with an unstable inhibitor, *Biochem. J.* **227**, 1025-1026.
- Tsou, C.L.(1962) Relation between modification of functional groups and their biological activity, *Sci. Sin. (Eng. Ed.)*, **11**, 1535-1541.
- Usuda, N., Yokota, S., Ichikawa, R., Hashimoto, T. y Nagata, T.(1991) Immunoelectron microscopic study of a new D-amino acid oxidase-immunoreactive subcompartment in rat liver peroxisomes, *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 95-102.
- Van der Vaart, J.M., Caro, H.P., Chapman, J.W., Klis, F.M. y Verrips, C.T.(1995) Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* **177**, 3104-3110.
- Vanoni, M.A., Pilone Simonetta, M., Curti, B., Negri, A. y Ronchi, S.(1987) Phenylglyoxal modification of arginines in mammalian D-amino-acid oxidase, *Eur. J. Biochem.* **167**, 261-267.
- Walaas, E. y Walaas, O.(1956) Kinetics and equilibria in flavoprotein systems. V. The effects of pH, anion and partial structure analogues of the coenzyme on the activity of D-amino acid oxidase, *Acta Chem. Scand.* **10**, 122-132.
- Walsh, C. (1979) D-Amino acid oxidase, en: *Enzymatic Reaction Mechanisms*, pp. 392-401. Freeman & Co., San Francisco.
- Walsh, C.T., Schonbrunn, A. y Abeles, R.H.(1971) Studies on the mechanism of action of D-amino acid oxidase. Evidence for removal of substrate -hydrogen as a proton, *J. Biol. Chem.* **246**, 6855-6866.
- Walsh, C.T., Krodell, E., Massey, V. y Abeles, R.H.(1973) Studies on the elimination reaction of D-amino acid oxidase with α -amino- β -chlorobutyrate. Further evidence for abstraction of substrate α -hydrogen as a proton, *J. Biol. Chem.* **248**, 1946-1955.
- Watanabe, F., Fukui, K., Momoi, K. y Miyake, Y.(1988) Effect of site-specific mutagenesis of tyrosine-55, methionine-110 and histidine-217 in porcine kidney D-amino acid oxidase on its catalytic function, *FEBS Lett.* **238**, 269-272.
- Watanabe, F., Fukui, K., Momoi, K. y Miyake, Y.(1989) Site-specific mutagenesis of lysine-204, tyrosine-224, tyrosine-228, and histidine-307 of porcine kidney D-amino acid oxidase and the implications as to its catalytic function, *J. Biochem. (Tokyo)*, **105**, 1024-1029.
- Wierenga, R.K., Drenth, J. y Schulz, G.E.(1983) Comparison of the three-dimensional protein and nucleotide structure of the FAD-binding domain of p-hydroxybenzoate hydroxylase with the FAD- as well as NADPH-binding domains of glutathione reductase, *J. Mol. Biol.* **167**, 725-739.
- Xia, Z.X., Shamala, N., Bethge, P.H., Lim, L.W., Bellamy, H.D., Xuong, N.H., Lederer, F. y Mathews, F.S.(1987) Three-dimensional structure of flavocytochrome b2 from baker's yeast at 3.0-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 2629-2633.
- Xia, Z.X. y Mathews, F.S.(1990) Molecular structure of flavocytochrome b2 at 2.4 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **212**, 837-863.
- Yagi, K., Ozawa, T. y Okada, K.(1959) Mechanism of inhibition of D-amino acid oxidase. II. Inhibitory actions of benzene derivatives, *Biochim. Biophys. Acta*, **35**, 102-107.
- Yagi, K., Kotaki, A., Naoi, M. y Okamura, K.(1966) Reaction of D-amino acid oxidase with D-lysine, *J. Biochem. (Tokyo)*, **60**, 236-238.
- Yagi, K.(1971) Reaction mechanisms of D-amino acid oxidase, *Adv. Enzymol.* **34**, 41-78.

- Yagi, K., Sugiura, N., Mizuno, M., Hirayama, T. y Kagamiyama, H.(1974) Primary structure of the N-terminal portion of D-amino acid oxidase, *J. Biochem. (Tokyo)*, 76, 1369-1371.
- Yagi, K. y Ohishi, N.(1972) Structure and function of D-amino acid oxidase. IV. Electrophoretic and ultracentrifugal approach to the monomer-dimer equilibrium, *J. Biochem. (Tokyo)*, 71, 993-998.
- Zwart, K.B., Overmars, E.H. y Harder, W.(1983) The role of peroxisomes in the metabolism of D-alanine in the yeast *Candida utilis*, *FEMS Microbiol. Lett.* 19, 225-230.

